



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di laurea

**SINTESI DI INIBITORI ALLOSTERICI DELLA PROTEINA
CHINASI-1 FOSFOINOSITIDE-DIPENDENTE (PDK1)**

Relatori:

Dott.ssa Simona Rapposelli

Dott.ssa Simona Sestito

Candidato:

Jacopo Jori

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

A mio nonno Renato

INDICE

• Introduzione Generale	4
- Il Pathway PI3K/PDK1/Akt	5
- PI3K	7
- PTEN	8
- PDK1	10
▸ <i>Struttura di PDK1</i>	11
▸ <i>Regolazione di PDK1</i>	12
- Akt	14
▸ <i>Effetti biologici conseguenti l'attivazione di Akt</i>	15
- mTOR	17
- PLC γ 1	18
- Pathway PDK1/PLC γ 1	19
- APPROCCI TERAPEUTICI	21
▸ INIBITORI PI3K	21
▸ INIBITORI PDK1	22
▸ INIBITORI Akt	26
▸ TERAPIE COMBinate	31
• Introduzione alla Parte Sperimentale	33
• Parte Sperimentale	42
• Bibliografia	54

INTRODUZIONE GENERALE

Il Pathway PI3K / PDK1 / Akt

L'attivazione anormale del pathway PI3K/PDK1/Akt è stata convalidata come un passo essenziale per l'avvio e il mantenimento dei tumori umani [1]. Tale cascata di segnalazione viene attivata a seguito dell'interazione di ligandi specifici, quali ad esempio insulina e fattori di crescita come EGF e IGF, con il recettore tirosin-chinasico (RTK). La formazione del complesso ligando-recettore provoca la dimerizzazione del recettore RTK e l'auto-fosforilazione dei residui di serina nella porzione citoplasmatica. Il complesso PI3K (p85-p110) viene reclutato dal citosol e l'interazione della subunità regolatoria (p85) con i residui di tirosina fosforilati del recettore causa l'attivazione della subunità catalitica (p110), con conseguente formazione di PIP₃ (Fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato) nella regione intracellulare. PIP₃ determina poi il reclutamento presso la membrana degli enzimi che presentano il dominio di legame PH (*Pleckstrin Homology*) specifico per il suddetto fosfolipide, fra cui PDK1, Akt e PLCγ1, regolandone l'attività.

In condizioni fisiologiche la produzione di PIP₃ è finemente regolata da due enzimi che lavorano in direzioni opposte: PI3K e PTEN. La chinasi catalizza la formazione di PIP₃ a partire da PIP₂ (Fosfatidilinositolo-4,5-difosfato), un fosfolipide di membrana che svolge un ruolo centrale nella trasduzione del segnale, mentre l'oncosoppressore PTEN defosforila PIP₃, antagonizzando così l'azione di PI3K.

Le chinasi coinvolte in questo pathway rivestono un ruolo molto importante nella regolazione dei processi cellulari come la differenziazione, la crescita e la trasformazione cellulare, il metabolismo lipidico e la sintesi proteica. È quindi evidente che un'attivazione incontrollata del pathway possa essere alla base di svariati processi cellulari che portano alla cancerogenesi.

In molte neoplasie le trasformazioni oncogene sono state correlate sia all'aumentata espressione genetica che alla mutazione nella forma costitutivamente attiva delle chinasi appartenenti al pathway PI3K/Akt. Tali osservazioni hanno portato all'ipotesi che potenti e selettivi inibitori delle

proteine chinasi possano essere efficaci, da soli o in combinazione con altri farmaci antitumorali, nel trattamento del tumore [2].

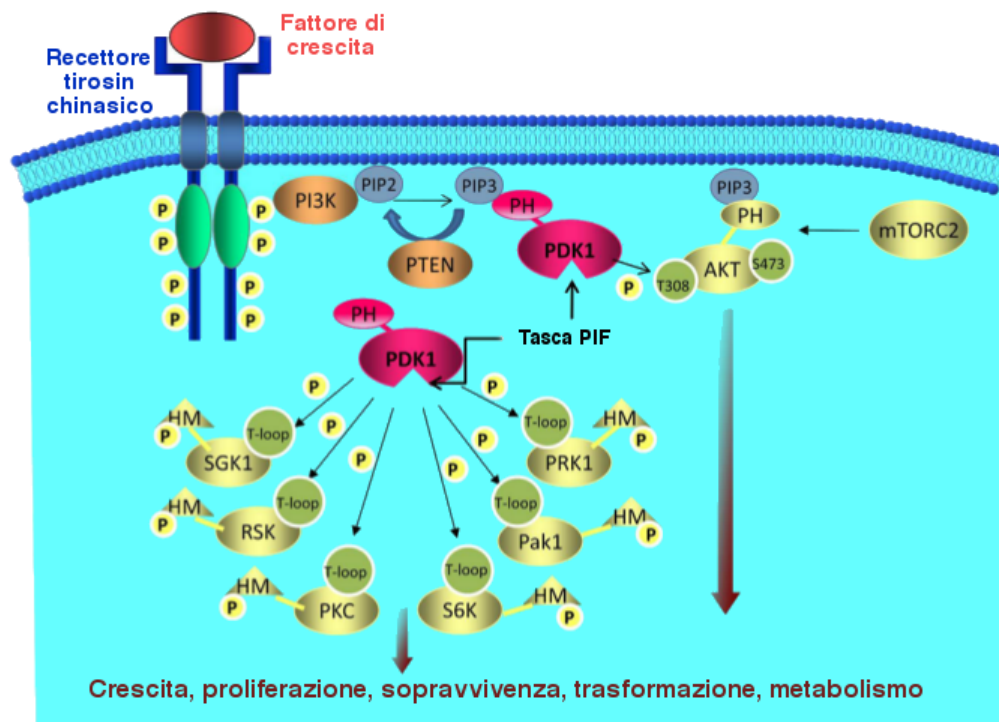


Figura 1. Pathway PI3K / PDK1 / Akt

Il pathway PI3K/PDK1/Akt svolge inoltre un importante ruolo nella chemioresistenza. Lo sviluppo di resistenza alla chemioterapia è uno dei problemi clinici maggiori e il fallimento dell'attivazione del processo apoptotico rappresenta un importante meccanismo di resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali. Tale pathway è il mediatore principale dei segnali di sopravvivenza e quindi una delle maggiori cause responsabili dell'insorgenza di resistenza alla chemioterapia.

PI3K

PI3K, fosfatidilinositolo-3-chinasi, è una famiglia di enzimi coinvolta in molteplici meccanismi cellulari come la crescita, la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la sopravvivenza cellulare. La famiglia di chinasi lipidiche comprende otto isoforme mammifere, raggruppate in tre classi. Le chinasi appartenenti alla classe I sono proteine eterodimere che catalizzano il trasferimento di un gruppo fosforico dell'ATP sul gruppo ossidrilico 3' di PIP₂ portando alla formazione di PIP₃; esso svolge la funzione di ligando nel reclutamento di proteine con dominio *Pleckstrin Homology* (PH) sulla faccia interna della membrana cellulare. Le chinasi appartenenti alla classe IA sono costituite da una subunità catalitica ed una subunità regolatoria. Le subunità catalitiche p110α, p110β o p110δ sono codificate dai geni PIK3CA, PIK3CB e PIK3CD rispettivamente. Le subunità regolatorie sono invece costituite da p85α (nelle isoforme p85α, p55α, p50α), p85β e p55γ, codificate dai geni PIK3R1, PIK3R2 e PIK3R3. La classe IB è composta da una sola subunità catalitica, P110γ, e due subunità regolatorie, p84 e p101. Le PI3K di classe II sono invece proteine monomeriche che comprendono tre isoforme: PI3KC2α, PI3KC2β e PI3KC2γ. La classe III è più simile strutturalmente alla classe I ed esiste come un eterodimero composto da una subunità catalitica (Vps34) ed una regolatoria (p150).

Le chinasi PI3K di classe IA sono attivate dalla stimolazione dei fattori di crescita attraverso i recettori tirosin-chinasici (RTK). La subunità regolatoria p85 si lega direttamente ai residui di fosfotirosina dei recettori RTK; questo legame abolisce l'inibizione intramolecolare della subunità catalitica p110 da parte di p85 e localizza PI3K nella membrana plasmatica, dove risiede il suo substrato PIP₃.

Una segnalazione incontrollata di PI3K è molto comune nel cancro. In cellule tumorali provenienti da colon, polmone, prostata, fegato e cervello sono state rilevate mutazioni a carico del gene PI3KA che codifica per p110α. Tale gene, oltre ad essere coinvolto nei processi di regolazione del ciclo e della crescita cellulare, acquisisce un ruolo persino più importante a carico delle cellule endoteliali, garantendo al tumore l'angiogenesi e, quindi, la costruzione di un

tessuto di irradiazione *ad hoc* sia per fini nutrizionali che per garantire una via di espansione lontana dalla lesione primaria.

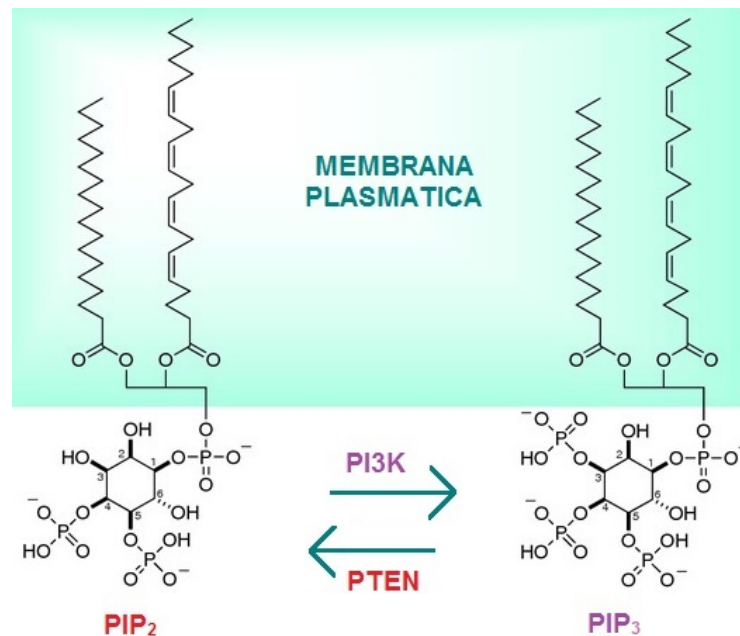


Figura 2. Azione di PI3K e PTEN

PTEN

PTEN (Fosfatasi e Tensina Omologa) è un enzima codificato dal gene PTEN, il secondo gene più frequentemente mutato nei tumori umani dopo TP53 [3]. La proteina PTEN svolge la funzione di fosfatasi lipidica, defosforilando PIP₃ a PIP₂ (Fig. 2). L'attività fosfatasica è fondamentale per la funzione di oncosoppressore di PTEN, poiché regola negativamente l'attivazione del pathway oncogeno PI3K/PDK1/Akt.

La funzione tumore soppressiva di PTEN viene meno in seguito a due principali mutazioni a carico del dominio fosfatasico: una comporta la perdita dell'attività fosfatasica sia sui lipidi che sulle proteine mentre l'altra compromette unicamente l'attività fosfatasica sui substrati proteici.

Oltre al ruolo nella regolazione della cascata di segnalazione PI3K/Akt, PTEN ha molti altri ruoli critici in vari aspetti della proliferazione del cancro tra cui: instabilità genomica, rinnovo delle cellule tumorali, senescenza cellulare, migrazione cellulare e metastasi. Infine, PTEN svolge un ruolo significativo nella regolazione delle microcondizioni ambientali adatte per la crescita del tumore [4].

Mutazioni nel gene PTEN sono documentate nel cancro di seno, prostata, endometrio, ovaie, colon, melanoma, glioblastoma e linfoma. Studi condotti su modelli animali hanno inoltre dimostrato che la perdita di una sola copia del gene PTEN è sufficiente per interrompere il segnale cellulare e iniziare una crescita incontrollata della cellula.

PDK1

Scoperta nel 1997 come chinasi responsabile della fosforilazione dell'ansa di attivazione di Akt, la proteina chinasi-1, 3-fosfoinositide dipendente (PDK1) è un enzima chiave nei pathways oncogeni PI3K/PDK1/Akt (Fig. 3) e PDK1/PLC γ 1.

PDK1 è una proteina chinasi della famiglia di chinasi AGC, di cui fanno parte la proteina chinasi A (PKA), proteina chinasi G (PKG), proteina chinasi C (PKC) e Akt (PKB). L'enzima regola l'attività chinastica di altri enzimi della stessa famiglia AGC tramite la fosforilazione di uno specifico residuo di treonina o serina all'interno del loop di attivazione (T-loop); tale fosforilazione è critica per l'attivazione del substrato. Molte delle chinasi attivate da PDK1 regolano processi cellulari quali la sopravvivenza cellulare, la differenziazione, la crescita e l'espressione delle proteine in risposta a segnali di secondi messaggeri.

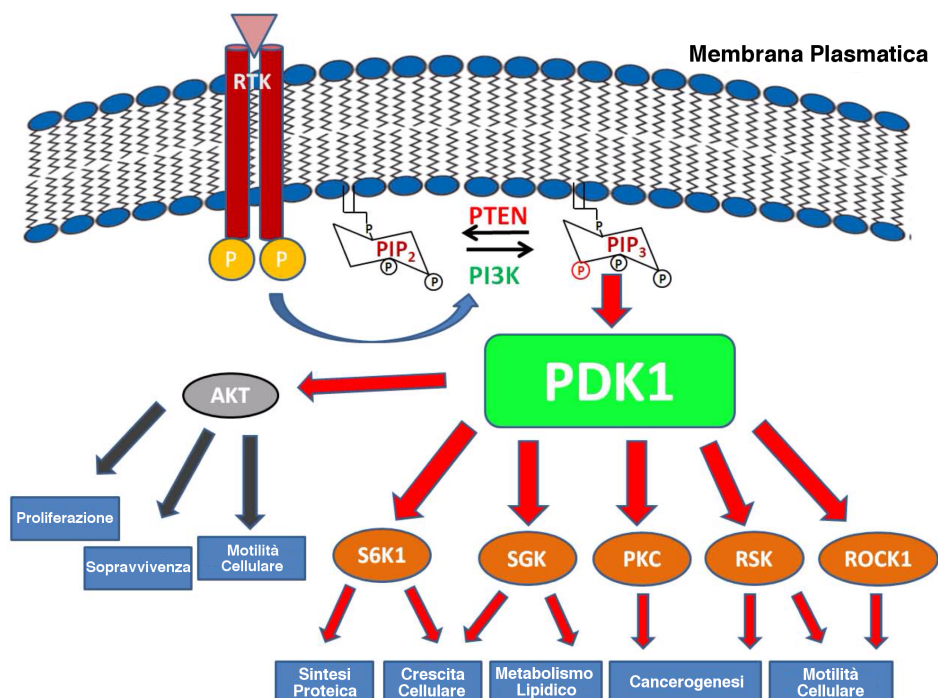


Figura 3. Ruolo di PDK1 nel pathway PI3K/PDK1/Akt

I substrati principali di PDK1 sono: PKB (proteina chinasi B)/Akt, p70, S6K (chinasi ribosomiale S6), SGK (chinasi sierica glucocorticoide dipendente). Solo in tempi più recenti è stato scoperto che PDK1 attiva anche PLC γ 1 (fosfolipasi

Cy1) [5], una fosfolipasi C specifica coinvolta nella regolazione di numerose funzioni cellulari tra cui il rimodellamento dell'actina nel citoscheletro e la migrazione cellulare, rivestendo così un ruolo chiave nella metastatizzazione del tumore e nell'angiogenesi [6]. Oltre alle diverse chinasi associate alle vie di segnalazione di PI3K e PLC γ 1, PDK1 fosforila anche proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPK) coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare.

PDK1, noto anche come “*master kinase*”, è stato identificato come uno dei più importanti enzimi responsabili della regolazione di svariate proteine chinasi della famiglia AGC e rappresenta quindi un *target* biologico molto interessante per lo sviluppo di potenziali agenti antitumorali.

Struttura di PDK1

PDK1 è un enzima di 556 aminoacidi dal peso molecolare di 63 kDa in cui si possono determinare due domini caratteristici principali (Fig. 4):

- Un dominio o nucleo catalitico, di sequenza aminoacidica 71-359, in cui si individuano un piccolo lobo N-terminale, avente un ripiegamento conformazionale a foglietti- β che comprende la Hinge Region (HR), e un grosso lobo C-terminale caratterizzato da una struttura ad α -elica. Tra i due lobi è presente il sito di legame dell'ATP (*ATP binding site*). Come altre chinasi AGC, PDK1 possiede un sito di fosforilazione all'interno del loop di attivazione (Ser241), che viene fosforilato nelle cellule quiescenti e non è influenzato dalla stimolazione dei fattori di crescita. La fosforilazione di PDK1 in Ser241 è catalizzata da una reazione di autofosforilazione [7]. Al contrario, PDK1 non possiede un motivo idrofobico (HM) C-terminale nel suo dominio catalitico, ma è stato proposto che abbia una tasca idrofobica detta PIF pocket (*PDK1 Interacting Fragment*), nel piccolo lobo [8]. La PIF pocket funziona come una piattaforma che abilita la chinasi ad interagire con alcuni dei propri substrati fisiologici. Tale motivo si trova in una sequenza conservata Phe-Xaa-Xaa-Phe/Tyr-Ser/Thr-Phe/Tyr e subisce la fosforilazione in serina o treonina.

- Un dominio PH C-terminale, di sequenza aminoacidica 459-550, deputato al legame con PIP_3 e quindi responsabile del reclutamento dell'enzima in prossimità della membrana. Questo dominio è fondamentale per l'attivazione di Akt ma non per quella degli altri substrati di PDK1; in assenza del dominio PH, PDK1 perde la capacità di fosforilare Akt, ma mantiene la capacità di fosforilare altri substrati come S6K, SGK, etc.

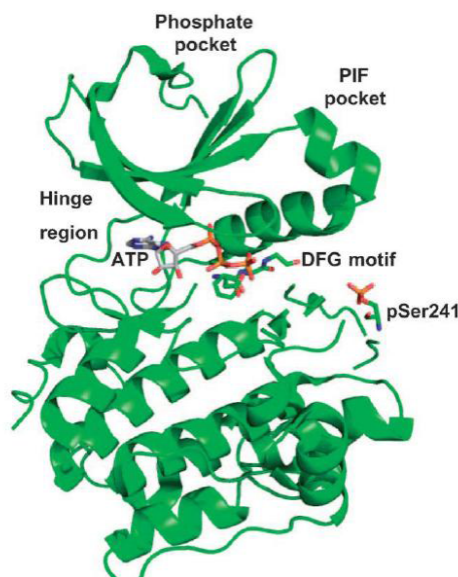


Figura 4. Struttura cristallografica di PDK1 con ATP

Regolazione di PDK1

La fosforilazione della proteina, che gioca un ruolo chiave in molti aspetti della biologia della cellula eucariotica, è un processo reversibile e dinamico mediato da chinasi e fosfatasi. Si pensa che PDK1 sia una chinasi costitutivamente attiva e che possieda meccanismi diversi per fosforilare substrati diversi.

L'attività di PDK1 è regolata dalla fosforilazione di diversi siti, a cui seguono la dimerizzazione e la *trans*-fosforilazione (Fig. 5). È tutt'oggi dibattuto se PDK1 traslochi presso la membrana dopo la stimolazione del fattore di crescita o se sia costitutivamente localizzata sulla membrana; comunque sia questa localizzazione è indispensabile per la fosforilazione di Akt in Thr308. I fattori di crescita inducono la traslocazione di Akt dal citoplasma alla membrana cellulare

in modo tale da avere una co-localizzazione presso la membrana di Akt e PDK1. Il reclutamento di Akt, dovuto al legame tra PIP_3 e il suo dominio PH, induce un cambiamento conformazionale nell'enzima che ne facilita la fosforilazione in Thr308 ad opera di PDK1 [7].

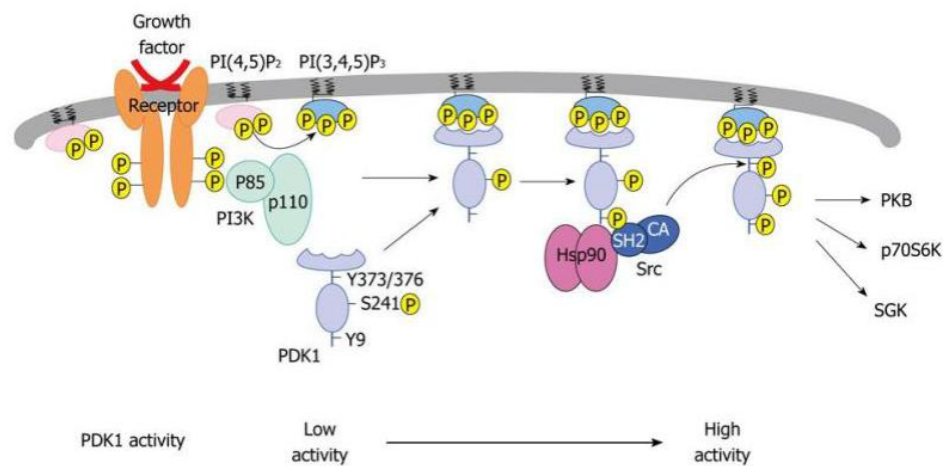


Figura 5. Meccanismo di regolazione di PDK1

Oltre che dall'attività chinastica, le funzioni di PDK1 risultano essere regolate dalle interazioni proteina-proteina e dalla sua localizzazione intracellulare.

Akt

Akt, o proteina chinasi B (PKB), è una serina/treonina chinasi della famiglia delle chinasi AGC. Esiste in 3 isoforme strutturalmente simili: Akt1, Akt2 e Akt3, note anche come PKB α , PKB β e PKB γ rispettivamente. Tutte e tre le isoforme sono composte dai seguenti domini caratteristici (Fig. 6):

- Dominio *Pleckstrin Homology* (PH): il dominio PH, dominio N-terminale, è una regione contenente da 100 a 120 aminoacidi trovata in oltre 250 proteine umane. Sebbene la sequenza aminoacidica dei domini PH non sia universalmente conservata, la struttura terziaria è notevolmente conservata. Tale dominio è responsabile del legame con PIP₃;
- LINK: dominio linker, regione cerniera di 39 aminoacidi. Il dominio LINK è la regione che collega il dominio PH con il dominio catalitico. Questo dominio è scarsamente conservato tra le isoforme di Akt (17-46% identici) e non ha alcuna omologia significativa con qualsiasi altra proteina umana [9];
- Dominio chinasi: è la porzione dell'enzima che lega ATP, si estende dagli aminoacidi 148-411 e termina in un motivo idrofobico regolatore (CTD). Contiene al suo interno una scanalatura idrofobica (HG) e il residuo chiave per l'attivazione dell'enzima Thr308. Il sito legante ATP di 25 residui è al 96-100% identico nelle tre isoforme. L'unico residuo che differisce è Ala230 in Akt1 e Ala232 in Akt2 rispetto a Val228 in Akt3;
- CTD: Akt termina con un dominio idrofobico C-terminale, in cui il motivo idrofobico risulta conservato nella famiglia delle chinasi AGC. Questi residui idrofobici svolgono un ruolo significativo nella completa attivazione di Akt per la fosforilazione del substrato. Al suo interno si trova un altro residuo chiave per l'attivazione dell'enzima, Ser473.



Figura 6. Struttura generale di Akt1

Mentre Akt1 è espressa ubiquitariamente ad alti livelli con eccezione di rene, fegato e milza [10], l'espressione di Akt2 è elevata a livello dei tessuti insulino-sensibili come il grasso bruno, il muscolo scheletrico e il fegato. L'espressione di Akt3 è ubiquitaria, anche se sono stati riscontrati bassi livelli di espressione nel fegato e nel muscolo scheletrico. Le varie isoforme di Akt risultano implicate in funzioni specifiche. Ad esempio, l'amplificazione e la sovraespressione di Akt2 è correlata all'aumento della motilità e dell'invasione cellulare, mentre una maggiore attività di Akt3 sembra contribuire all'aggressività dei tumori insensibili agli ormoni steroidei [11].

Tutte e tre le isoforme di Akt sono attivate attraverso due eventi di fosforilazione cruciali, la prima delle quali avviene su un residuo di treonina nel loop di attivazione T (T308 in Akt1, T309 in Akt2 e T305 in Akt3) ad opera di PDK1, mentre la seconda avviene su un residuo di serina nel motivo idrofobico (S473 in Akt1, S474 in Akt2 e S472 in Akt3) ed è mediata da diverse chinasi tra cui le stesse PDK1 e Akt [12].

Effetti biologici conseguenti l'attivazione di Akt

Una volta attivata, Akt riconosce e fosforila residui di serina o treonina di numerosi substrati implicati nella proliferazione e crescita cellulare. Tra i bersagli a valle di Akt (oltre 30) ve ne sono alcuni coinvolti direttamente in processi che, in condizioni non patologiche, mediano il normale funzionamento fisiologico cellulare, ma che una volta mutati diventano basilari per la crescita incontrollata della cellula tumorale (Fig. 7).

L'inattivazione di fattori come la caspasi-9 e BAD (*Bcl-2 associated death promoter*), entrambi coinvolti nell'attivazione della morte programmata, porta all'inibizione dell'apoptosi e quindi alla sopravvivenza della cellula neoplastica.

La proliferazione è invece causata dall'inibizione da parte di Akt della sottofamiglia FoxO (*forkhead box transcription factors*) e delle proteine inibitrici del ciclo cellulare p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}. L'effetto cumulativo di tali inibizioni è una stabilizzazione dell'espressione della Ciclina D1, il cui accumulo favorisce la progressione del ciclo cellulare.

Attraverso l'attivazione di GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*) e di PFK2 (*6-phosphofructo-2 kinase*) vengono stimulate invece la biosintesi di glicogeno e la sintesi proteica che, insieme all'attività angiogenetica che segue l'attivazione di eNOS (*eukariotic nitric oxide synthase*), garantiscono la crescita cellulare e quindi la sopravvivenza della nuova massa tumorale in accrescimento [2].

Il substrato a valle meglio studiato di Akt è la chinasi mTOR. Akt può fosforilare direttamente e attivare mTOR, così come può causare l'attivazione indiretta di mTOR fosforilando e inattivando TSC2 (sclerosi tuberosa 2, detto anche tuberina), che normalmente inibisce mTOR. La conseguenza dell'attivazione di mTOR è un'aumentata traduzione delle proteine.

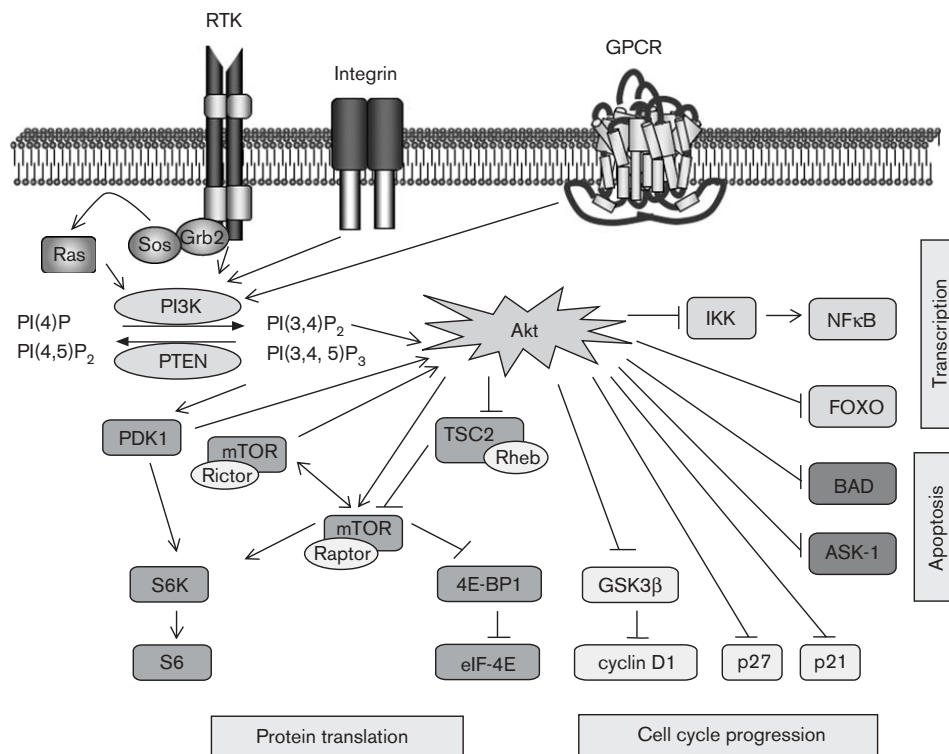


Figura 7. Vie di segnalazione di Akt

Infine, è stato recentemente mostrato che l'attività di Akt può essere regolata negativamente dal dominio PH della fosfatasi ricco di leucine ripetute (PHLPP) che defosforila specificamente il motivo idrofobico di Akt (Ser473 in Akt1). Questo meccanismo nella regolazione di Akt coinvolge la proteina 51 legante

FK506 (FKBP51), che funziona come una proteina di sostegno per Akt e PHLPP, e promuove la defosforilazione di Akt. FKBP51 è stato proposto come un regolatore negativo nel pathway di Akt, con implicazioni potenzialmente importanti nella risposta alla chemioterapia [13].

L'iperattivazione di Akt è stata riscontrata in numerosi tipi di tumore come il mieloma multiplo, il cancro al polmone, il glioblastoma, il cancro al seno, etc.

mTOR

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) è una serina/treonina chinasi che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza cellulare, la trascrizione e la sintesi proteica [14]. mTOR ha un ruolo di rilevanza nella regolazione del bilancio energetico del corpo e del suo peso; è attivata da aminoacidi, glucosio, insulina e altri ormoni implicati nella regolazione del metabolismo.

Studi recenti hanno dimostrato che mTOR non solo è substrato di Akt, ma anche un suo attivatore cruciale: mTOR forma infatti un complesso con la proteina RICTOR (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) per poi fosforilare direttamente Ser473 di Akt. L'attivazione di questo complesso (TORC2) potrebbe spiegare il sequestro delle molecole di mTOR appena formatesi all'interno delle cellule durante i trattamenti a lungo termine con rapamicina. Questo farmaco è infatti particolarmente efficace nell'indurre apoptosi e nel sopprimere la proliferazione delle cellule che sovraesprimono Akt in quanto, col passare del tempo, interferisce con il riassetto del complesso entrandone a far parte [15].

PLC γ 1

La fosfolipasi γ 1 fa parte della famiglia delle fosfolipasi C fosfoinositide specifiche (PLC), i cui membri convertono PIP_2 nei secondi messaggeri Diacilglicerolo (DAG), lipide di membrana che tramite proteina G richiama PKC in prossimità della membrana plasmatica, e Inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3), che tramite il proprio recettore determina il rilascio di ioni calcio all'interno della cellula (Fig. 8).

PLC γ 1 viene attivata tramite la fosforilazione del residuo critico di tirosina Tyr783. Questa fosforilazione è necessaria ma non sufficiente a dare piena attivazione dell'enzima. Un altro meccanismo di attivazione è collegato alla concentrazione di PIP_3 , il prodotto di PI3K, che induce l'attivazione di PLC γ 1 tramite il legame con il dominio PH dell'enzima.

PLC γ 1 ha un ruolo ben definito nella mediazione della segnalazione cellulare in caso di attivazione di diversi recettori tirosin-chinasici (RTK), compreso il recettore del fattore di crescita epidermico, il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine e molti altri. Sono state scoperte molte funzioni cellulari regolate dall'attivazione di PLC γ 1.

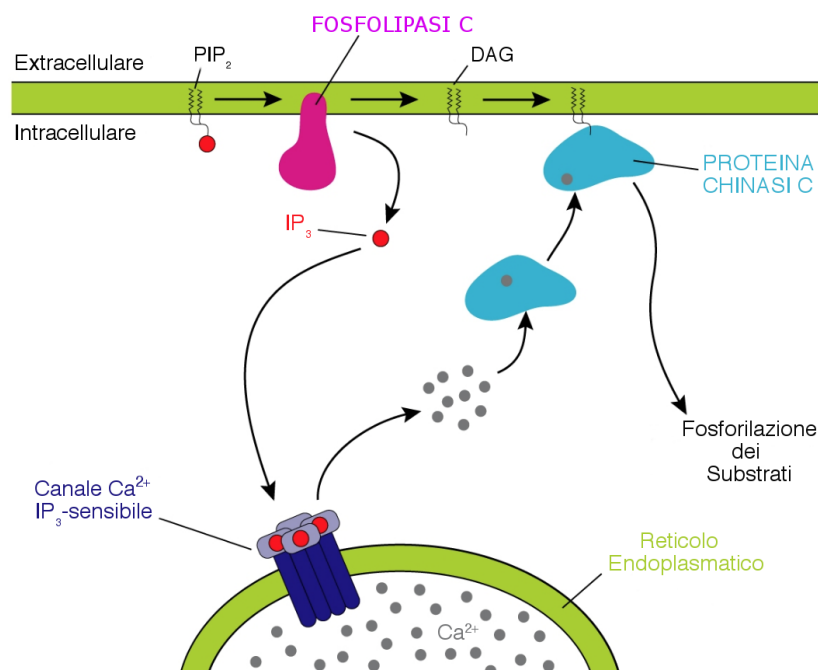


Figura 8. Scissione di PIP_2 in DAG e IP_3

Alcuni studi hanno dimostrato che PLC γ 1, attivata dai fattori di crescita attraverso la fosforilazione da parte di PDK1, garantisce alla cellula tumorale la capacità di metastatizzare, oltre a giocare un ruolo nei meccanismi di angiogenesi. PLC γ 1 è infatti coinvolta nella dissoluzione dei contatti adesivi cellula-cellula e nell'aumento delle molecole di adesione cellula-matrice al fine di garantire un fenotipo migratorio e invasivo alla cellula tumorale: per ottenere questa autonomia la cellula deve presentare un'attivazione dei recettori RTK (per garantire la migrazione) e l'inattivazione dei CAM cellula-cellula, ovvero di quelle glicoproteine transmembranaliali che saldano le cellule contigue [16].

Pathway PDK1 / PLC γ 1

Studi recenti hanno evidenziato l'esistenza di una diretta attivazione della fosfolipasi PLC γ 1 ad opera della chinasi PDK1, suggerendo così che il pathway PDK1/PLC γ 1 rivesta un ruolo importante nella metastatizzazione e nell'invasione delle cellule tumorali.

Il meccanismo di attivazione di PLC γ 1 PDK1-dipendente comporta l'interazione dei due enzimi in un complesso proteico a seguito della stimolazione del recettore EGFR ad opera del fattore EGF (Fig. 9).

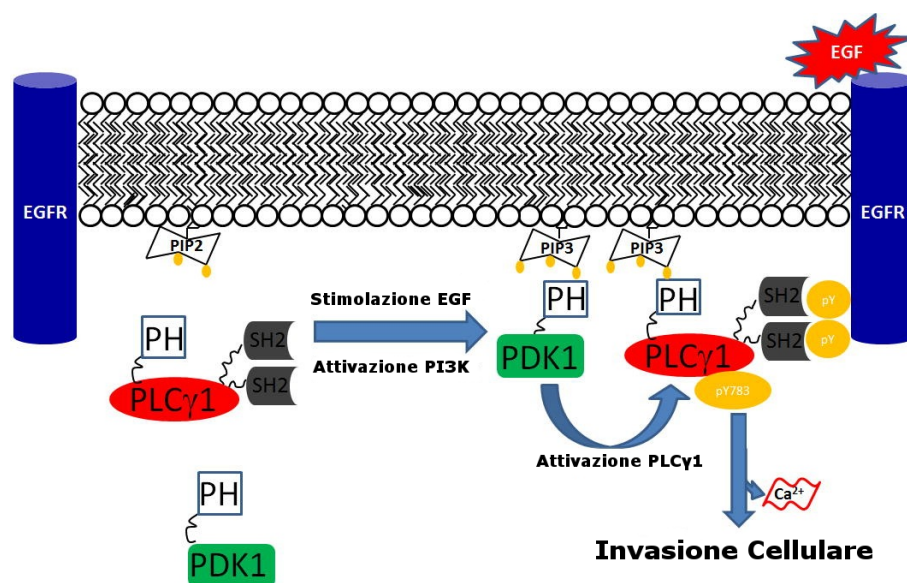


Figura 9. Pathway PDK1 / PLC γ 1

In condizioni non stimulate, il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) non è fosforilato, PI3K non è attivata e sia PDK1 che PLC γ 1 sono limitate nel citosol. Dopo stimolazione da parte di EGF, il recettore EGFR viene fosforilato, PI3K viene attivata e PIP $_2$ è convertito in PIP $_3$. Il legame di PIP $_3$ con il dominio PH di PDK1 recluta l'enzima alla membrana plasmatica. Attraverso un'interazione simile anche PLC γ 1 viene reclutato alla membrana plasmatica ed associato ai residui di tirosina fosforilati del recettore attraverso i suoi domini SH2. L'attivazione di PLC γ 1 in maniera PDK1-dipendente garantisce un ulteriore livello di interazione e stabilizza ulteriormente l'associazione di PLC γ 1 al recettore, consentendo la fosforilazione della tirosina Tyr783 di PLC γ 1.

APPROCCI TERAPEUTICI

Nel corso degli anni numerosi studi hanno portato ad individuare il pathway PI3K/PDK1/Akt come un interessante bersaglio terapeutico per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali e/o chemiosensibilizzanti. Gli sforzi dell'industria farmaceutica e del mondo accademico si sono concentrati sulla progettazione di molecole che potessero inibire tale sistema di segnalazione o attraverso la progettazione di molecole selettive per un determinato bersaglio farmacologico appartenente al pathway stesso, o attraverso molecole ibride capaci di alterare il pathway agendo simultaneamente a più livelli.

Tra i composti più interessanti sintetizzati fino ad oggi si ritrovano gli antagonisti dei recettori dei fattori di crescita, gli inibitori di PI3K e di altre chinasi quali PDK1, Akt e mTOR.

L'obiettivo di tutte queste molecole è quello di inibire l'iperattivazione anomala del pathway e comprendere meglio i meccanismi cellulari alla base di esso, per essere in grado in futuro di sviluppare terapie efficaci nella cura del cancro.

INIBITORI PI3K

PI3K è il bersaglio a monte del pathway ed è stato il primo studiato. Tramite la scoperta di inibitori di PI3K (Fig. 10) è stato possibile comprendere tutti i processi cellulari collegati all'enzima. Il primo inibitore di PI3K scoperto è stato Wortmannin (1) nel 1993, un metabolita furanosteroidico del fungo *Penicillium funiculosum*. Immediatamente dopo, è stato descritto un altro composto, LY294002 (2), come il primo inibitore sintetico di PI3K, anche se meno potente di Wortmannin. LY294002 è un inibitore PI3K competitivo e reversibile dell'ATP.

Tra i primi inibitori PI3K isoforma-specifici sviluppati, IC87114 (3) ha mostrato un blocco selettivo di p110 δ ed è stato usato per dimostrare che p110 δ può svolgere un ruolo nella patofisiologia della leucemia mieloide acuta. Sono stati

scoperti anche inibitori specifici di p110 β e p110 γ mentre non sono attualmente noti composti in grado di inibire selettivamente p110 α o PI3K di classe II.

Il trattamento con inibitori di PI3K come agenti singoli può indurre l'inibizione della proliferazione di cellule tumorali a cui segue apoptosi e morte cellulare. La combinazione di inibitori di PI3K con altri agenti terapeutici ha spesso prodotto effetti sinergici nell'inibizione della crescita tumorale sia in modelli sperimentali che in alcuni test clinici. I risultati clinici ottenuti con gli inibitori di PI3K però non hanno confermato le aspettative generate dai dati preclinici, in particolare se utilizzati come agenti singoli.

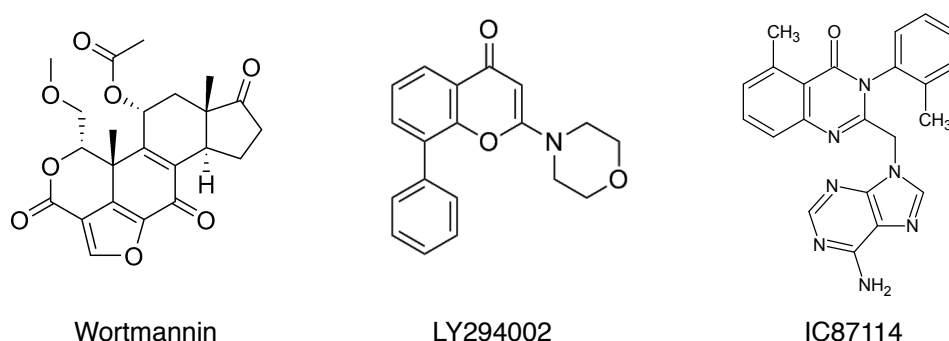


Figura 10. Strutture dei principali inibitori di PI3K

INIBITORI PDK1

Anche se PDK1 svolge un ruolo centrale nel cancro, ad oggi sono stati sviluppati solo pochi inibitori specifici di PDK1. Questa contraddizione è principalmente dovuta alla difficoltà nel mettere a punto un inibitore selettivo per PDK1, dato l'elevato grado di conservazione del dominio di legame per l'ATP nella famiglia delle chinasi AGC.

Sempre più ricercatori si sono dedicati alla sintesi di molecole in grado di inibire PDK1 al fine di bloccare l'attivazione del pathway PI3K/PDK1/Akt, in quanto esso non solo determina il blocco di Akt, ma anche di altre chinasi AGC coinvolte in eventi proliferativi quali l'invasività tumorale, l'angiogenesi e la progressione.

Gli inibitori di PDK1 possono essere raggruppati in 3 classi:

1. *Inibitori del binding-site dell'ATP;*
2. *Inibitori del dominio PH;*
3. *Inibitori della tasca PIF.*

1. Inibitori del binding-site dell'ATP

La maggior parte dei composti che inibiscono PDK1 ha la capacità di mimare la molecola di ATP e si lega al posto di essa all'interno del sito chinasi dell'enzima. Essi presentano però il limite di interagire anche con le altre chinasi con conseguente comparsa di effetti off-target e/o tossicità.

Uno degli inibitori di PDK1 ATP-competitivi di rilievo è il composto GSK2334470 (4). Questo composto, scoperto nel 2011, mostra una eccellente affinità ($IC_{50} = 2.5$ nM) ed elevata selettività per PDK1 rispetto ad altre chinasi esaminate come ad esempio Akt1 ($IC_{50} > 10000$ nM), ROCK1 ($IC_{50} = 7943$ nM) e altre chinasi che influenzano il ciclo cellulare come Aurora A ($IC_{50} = 39810$ nM) e Aurora B ($IC_{50} = 3162$ nM). Studi cellulari hanno dimostrato però che il composto 4 non ha inibito Akt in risposta a condizioni che stimolano il pathway PI3K/Akt. Ciò è stato spiegato dal doppio meccanismo di attivazione di Akt da parte di PDK1, per cui quantità residue di PDK1 non inibito potrebbero comunque attivare Akt. Ciò rende molto difficile sopprimere completamente l'attivazione di Akt con inibitori di PDK1 quali GSK2334470 come agenti singoli [17].

Altri due inibitori di PDK1 che si legano alla forma attiva della chinasi sono i composti 5 e 6 (Fig. 11), che mostrano una IC_{50} nei confronti di PDK1 di 1.4 nM. Il gruppo fenilico sembra essere essenziale per garantire una buona affinità per il sito di legame di PDK1 dato che dovrebbe riempire la tasca sotto il G-loop. Questi due composti, così come GSK2334470, hanno però mostrato solo effetti modesti nel prevenire la crescita delle cellule tumorali.

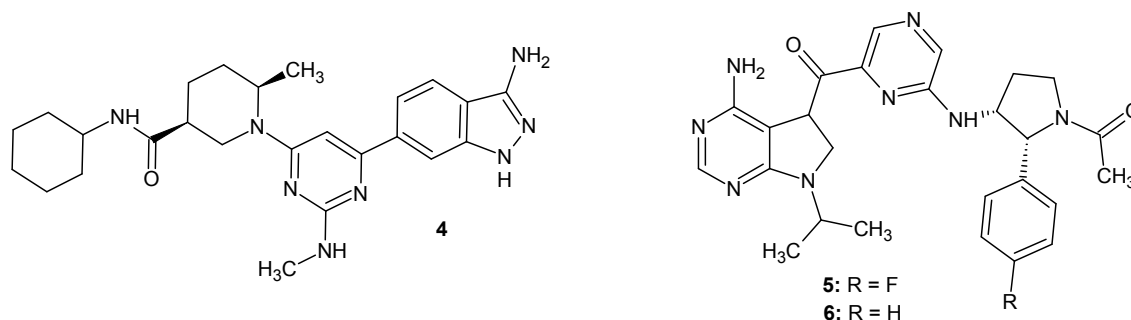


Figura 11. Inibitori di PDK1 ATP-competitivi

L'inibitore di PDK1 più selettivo risulta essere, ad oggi, il composto 7 (Fig. 12), identificato attraverso la tecnologia di rilevazione basata sui frammenti nota come *tethering with extenders*. Diversamente dai composti precedenti, questo composto si lega alla conformazione inattiva di PDK1 (*DFG-out*), una modalità di associazione che potrebbe spiegare la notevole selettività chinasi di 7. Il composto ha infatti mostrato una selettività maggiore di 3000 volte contro 256 chinasi testate. Il composto 7 ha inoltre un'elevata potenza con una IC_{50} di 2 nM ed una EC_{50} di 400 nM in saggio cellulare. Studi cellulari in cellule PC-3 con il composto 7 a 5 μ M hanno rivelato non solo l'inibizione della fosforilazione di Akt in Thr308 e RSK in Ser221, ma anche una lenta inibizione dipendente dal tempo del sito di autofosforilazione di PDK1 (p-PDK1 Ser241), con una riduzione approssimativamente del 70% nella fosforilazione a 48 h. Altri inibitori di PDK1 noti per legarsi alla forma attiva della chinasi (*DFG-in*) non provocano una significativa defosforilazione di p-PDK1 Ser-241 nelle cellule, per cui si ipotizza che la defosforilazione osservata con il legame del composto 7 alla forma inattiva della chinasi, renda vulnerabile l'enzima alle fosfatasi. Infine, la valutazione dell'effetto inibitorio del composto 7 sulla crescita delle cellule tumorali in soft agar suggerisce che inibitori potenti e selettivi di PDK1, in particolare della forma *DFG-out* dell'enzima, potrebbero essere utilizzati per inibire le metastasi.

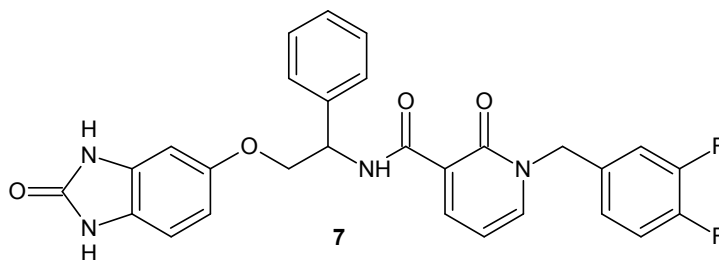


Figura 12. Struttura del composto 7

2. Inibitori del dominio PH

Il dominio PH è il sito di PDK1 responsabile del legame con PIP_3 ; questo legame è fondamentale per l'attivazione di Akt. Un inibitore del dominio PH di PDK1 è un analogo sintetico dell'inositolo-1,3,4,5,6-pentafosfato (InsP_5), denominato 2-O-benzil-mio-inositolo-1,3,4,5,6-pentafosfato (2-O-Bn- InsP_5 , 8). Il composto 8 (Fig. 13) è un inibitore altamente specifico di PDK1 ($\text{IC}_{50} = 27 \text{ nM}$) e possiede una maggiore attività pro-apoptotica e anti-tumorale rispetto alla molecola precursore InsP_5 . Uno screening su quasi 60 chinasi differenti ha rivelato che questo composto inibisce con elevata potenza e specificità PDK1 in vitro e la fosforilazione di Akt in Thr308. È stato proposto che gli inositolo fosfati, legandosi al dominio PH di PDK1, mantengano l'enzima nel citosol, impedendo così la fosforilazione di Akt a livello della Thr308.

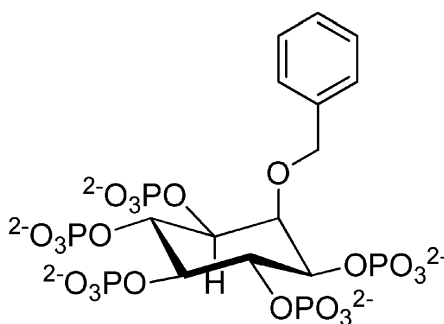


Figura 13. L'inibitore del dominio PH di PDK1 2-O-Bn- InsP_5

3. Inibitori della tasca PIF

La tasca PIF è il sito di aggancio necessario per l'interazione di PDK1 con tutti i suoi substrati ad eccezione di Akt; è quindi un sito interessante per lo sviluppo di piccole molecole con funzione inibitoria. La maggior parte dei composti che inibiscono la tasca PIF di PDK1 hanno nella loro struttura una funzione carbossilica che dovrebbe mimare il gruppo fosfato dell'*hydrophobic motif* (HM) fosforilato. Inoltre, questa funzionalità carbossilato è incorporata tra due anelli aromatici (frazioni idrofobe), che probabilmente mimano due residui di fenilalanina sulla HM delle chinasi substrato. Tra i composti sintetizzati il composto 9, un derivato dell'acido 2-(3-oxo-1,3-difenilpropil) malonico (Fig. 14) ha mostrato una AC_{50} di 2 μ M, migliore rispetto agli analoghi con un solo gruppo carbossilico. Gli studi cellulari con questi composti contenenti il carbossilato sono stati però ostacolati a causa della loro scarsa permeabilità cellulare, probabilmente dovuta alla carica negativa associata alla funzionalità carbossilica. Per ovviare a questo problema è stato sintetizzato il profarmaco diestereo 10 (Fig. 14).

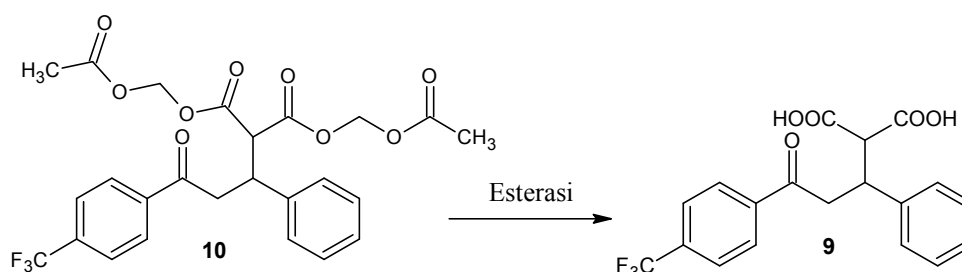


Figura14. Inibitori della tasca PIF di PDK1

Dato il ruolo centrale di PDK1 nei processi cellulari oncogeni, un inibitore selettivo dell'enzima potrebbe rivelarsi molto utile nel trattamento del tumore e, soprattutto, nel contrastare la diffusione delle metastasi, che rappresenta la principale causa di morte nel cancro.

INIBITORI Akt

La serina/treonina chinasi Akt gioca un ruolo centrale nella proliferazione e nella sopravvivenza della cellula tumorale e presenta tutte le caratteristiche per essere un buon *target* per la terapia antitumorale; tuttavia gli inibitori di Akt al momento in valutazione clinica sono ancora poco numerosi. Lo sviluppo di nuovi inibitori sembra progredire a rilento e ciò è attribuibile alla mancanza di specificità di legame e alla conseguente elevata tossicità [20].

Gli inibitori di Akt si possono classificare in:

1. *Inibitori del sito chinamico;*
2. *Inibitori del dominio PH;*
3. *Inibitori allosterici.*

1. *Inibitori competitivi del sito chinamico*

Le ricerche rivolte all'identificazione di piccoli inibitori capaci di legarsi al sito chinamico di Akt, in particolare alla tasca di legame per l'ATP, sono state molteplici. La maggior parte dei composti di questo tipo sono scarsamente selettivi. Analogamente agli inibitori di PDK1 e PI3K visti precedentemente, anche in questa classe di composti l'ostacolo principale nell'ottenere molecole maggiormente selettive è nell'alto grado di omologia del sito di legame dell'ATP tra le chinasi.

La scoperta della struttura e della composizione dei siti attivi delle chinasi e dei complessi che i ligandi ATP-competitivi formano col recettore ha permesso di sviluppare inibitori più selettivi. Questa selettività non riguarda solo le chinasi, che divergono nella struttura primaria, ma anche le isoforme di uno stesso enzima con strutture molto simili. Recentemente sono stati riportati composti con struttura isochinolino-solfonammidica aventi un IC_{50} nel range del submicromolare. Il legame con la tasca per il sito ATP viene mimato attraverso l'introduzione di un sostituito benzilossilico (Fig. 15).

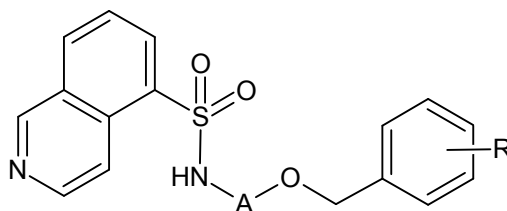


Figura 15. Struttura isochinolino-solfonammidica benzilossi-sostituita

Un altro nucleo che ha dimostrato essere un interessante scaffold è quello piridinico disostituito in 3 e 5. In particolare, l'inserimento di una catena laterale contenente un gruppo indolico in posizione 3 (Fig. 16a) provoca un aumento dell'attività su Akt1 di circa 300 volte. In questi composti l'ammina primaria nella catena laterale sembra essere critica per l'attività; l'N-metilazione dell'indolo diminuisce l'attività.

Il derivato più potente è A-443654 (Fig. 16b). È un forte induttore apoptotico con buona attività antiproliferativa, soprattutto quando associato ai chemioterapici classici. A-443654 non è somministrabile oralmente a causa della bassa biodisponibilità: tale problema ha portato alla sintesi di A-674563 (Fig. 16c) che presenta una maggiore biodisponibilità, ma possiede anche un'attività 70 volte minore [18].

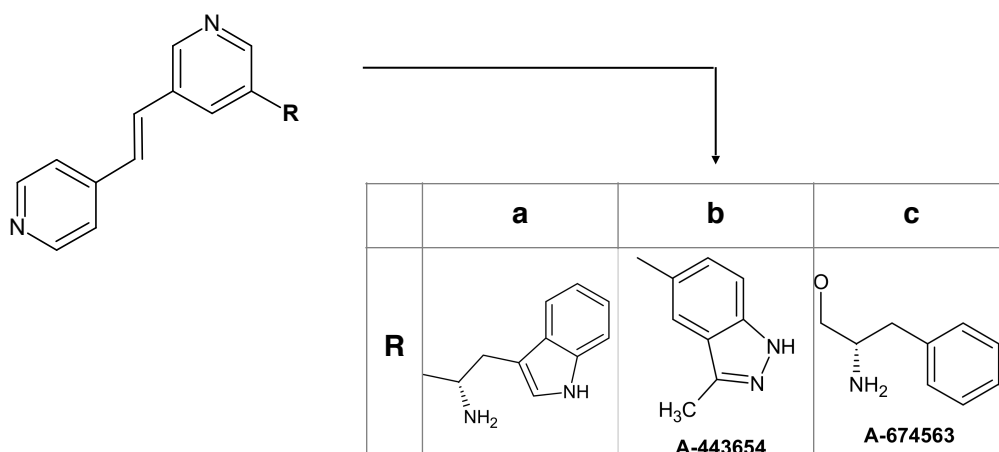


Figura16. Ottimizzazione in 3 dei derivati

Il progresso nello sviluppo di inibitori di Akt riguardanti il dominio chinasi è stato però lento e deludente, soprattutto a causa dell'elevata omologia della

tasca di legame di ATP in varie chinasi così come il fatto che l'inibizione di Akt è spesso associata con l'inibizione promiscua della famiglia delle chinasi AGC (proteine chinasi A, G e C). La vasta conservazione del dominio di legame ATP all'interno della famiglia delle chinasi AGC si è rivelato un ostacolo importante nello sviluppo di piccole molecole inibitrici contro Akt.

2. Inibitori del dominio PH

Gli inibitori dell'attivazione di Akt, o inibitori del dominio PH, impediscono l'interazione di Akt con la membrana e la sua conseguente attivazione. Al contrario del dominio ATPasico, presente in tutte le chinasi, il dominio PH N-terminale è presente in un numero di chinasi molto minore, suggerendo che l'utilizzo di tale dominio come *target* potrebbe portare alla sintesi di inibitori più selettivi. Gli inibitori del dominio PH di Akt interferiscono con il legame con PIP₃ e la conseguente traslocazione di membrana e attivazione dell'enzima da parte di PDK1. Gli inibitori di questa categoria sono generalmente tutti a base lipidica.

La prima serie di inibitori del dominio PH di Akt è quella degli alchilfosfolipidi (ALPs). Gli alchilfosfolipidi sintetici sono lipidi eterei permeabili di membrana con una singola catena alchilica lunga, che facilita il loro inserimento nel foglietto esterno della membrana plasmatica. Gli ALPs sono relativamente resistenti alla degradazione da parte delle fosfolipasi, si accumulano all'interno della membrana plasmatica alterando così la sintesi di fosfolipidi *de novo* nella membrana e la traslocazione di membrana di Akt.

Tra i vari ALPs ritroviamo perifosina, miltefosina ed edelfosina; questi tre composti hanno dimostrato di inibire i segnali di Akt in vitro. Ad oggi, l'inibitore più caratterizzato e più sviluppato di Akt è perifosina (Fig. 17), un alchilfosfolipide attualmente in fase clinica per l'applicazione di varie forme tumorali quali ad esempio i tumori solidi in fase avanzata, i tumori metastatici e i linfomi cutanei. Le tossicità attualmente riscontrate di perifosina sono quelle gastrointestinali come nausea, vomito e diarrea.

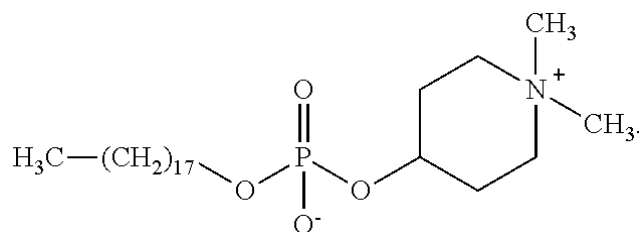


Figura 17. *Struttura di Perifosina*

La seconda serie di inibitori del dominio PH di Akt riguarda gli analoghi eterici fosfatidilinositolici (PIAs). Tra i PIAs finora sintetizzati, i più potenti (Fig. 18) presentano due modifiche sull'anello inositico e inibiscono Akt con IC_{50} con valori nel range micromolare, diminuendo la fosforilazione di molti substrati a valle senza interferire con chinasi a monte come PDK1 e PI3K. Tali derivati inoltre inducono l'apoptosi in linee cellulari tumorali con alta attività di Akt endogena; ciò rende i PIAs efficaci inibitori di Akt e identifica il dominio PH come bersaglio terapeutico.

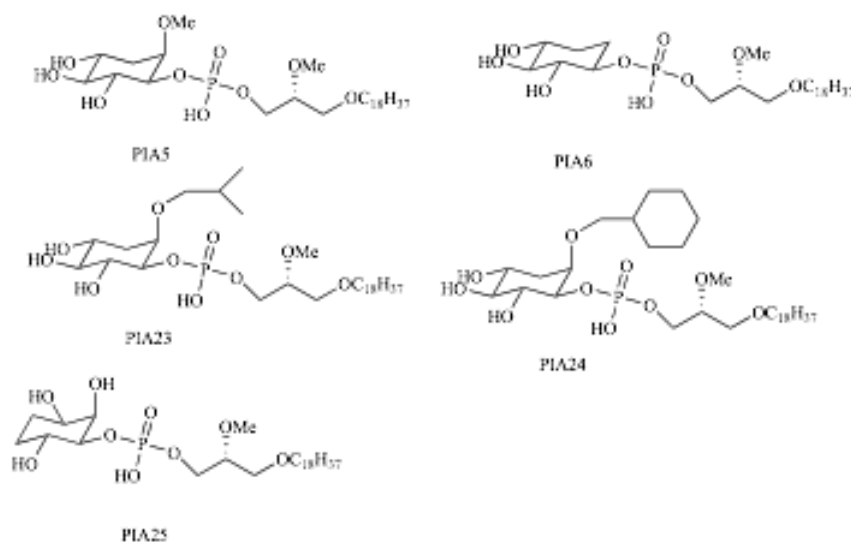


Figura 18. *Struttura dei PIAs più rappresentativi*

I principali problemi con le molecole a base di lipidi sono: limitata solubilità, potenza moderata contro la chinasi Akt, aggregazione e farmacocinetica scadente.

3. Inibitori allosterici

Il meccanismo d'azione degli inibitori allosterici di Akt non è completamente chiarito; questi composti si legano in una porzione dell'enzima, alterandone la struttura terziaria, in modo da diminuire l'affinità dell'enzima per il substrato.

MK-2206 (Fig. 19) è un inibitore allosterico di Akt attivo per via orale che è in fase di sviluppo per il trattamento dei tumori solidi. MK-2206 è un inibitore molto potente e selettivo ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$).

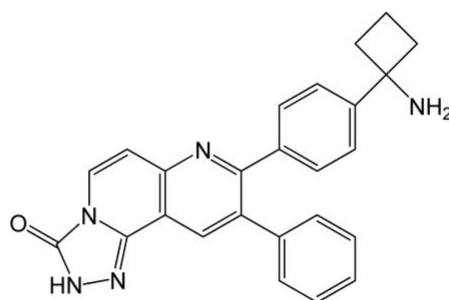


Figura 19. *Struttura di MK-2206*

Terapie combinate

Molti dei composti elencati hanno mostrato diversi ostacoli nell'utilizzo come farmaci in monoterapia; un'ulteriore strategia terapeutica adottata per inibire il pathway PI3K/PDK1/Akt è la combinazione di inibitori di componenti diversi del pathway. Ad oggi, le conoscenze acquisite indicano che nella via di segnalazione sono presenti decine di regolatori o effettori che mediano la sopravvivenza, l'evasione dell'apoptosi, la proliferazione e l'angiogenesi delle cellule tumorali. Pertanto, una terapia focalizzata su più nodi del pathway può essere efficace per il trattamento di tumori specifici resistenti alla monoterapia.

Un altro aspetto importante da valutare è che i componenti del pathway PI3K/PDK1/Akt hanno dimostrato di controllare la resistenza delle cellule tumorali alle terapie antitumorali standard. Sebbene molti composti elencati non siano utilizzabili come agenti singoli, è stato dimostrato che essi hanno un ruolo importante nella sensibilizzazione del cancro alla chemioterapia tradizionale. Ad esempio, gli inibitori di PI3K Wortmannin e LY294002 sono in grado di sensibilizzare le cellule tumorali ai chemioterapici tradizionali, mentre l'inibitore di PDK1 2-O-Bn-InsP₅ migliora gli effetti pro-apoptotici di cisplatino ed etoposide e sensibilizza le cellule di cancro al seno al tamoxifene. Per cui, se fosse difficile raggiungere un indice terapeutico accettabile, gli inibitori del pathway potrebbero trovare un impiego clinico a dosi più basse come sensibilizzanti a radiazioni o chemioterapici, per ridurre la tossicità dei farmaci antitumorali impiegati in clinica.

INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

Il pathway PI3K/PDK1/Akt regola numerose funzioni cellulari che sono considerate critiche per la cancerogenesi come ad esempio la proliferazione, la crescita e la motilità cellulare. I componenti di tale pathway sono iperespressi o iperattivi in varie forme tumorali. I risultati ottenuti dalle ricerche condotte negli ultimi anni hanno contribuito a definire tale via di segnalazione come un importante *target* per lo sviluppo di strategie terapeutiche anticancro.

È stato recentemente dimostrato che tale sistema di trasduzione può favorire lo sviluppo di neoplasie sia attraverso meccanismi Akt-dipendenti che Akt-indipendenti (Fig. 20).

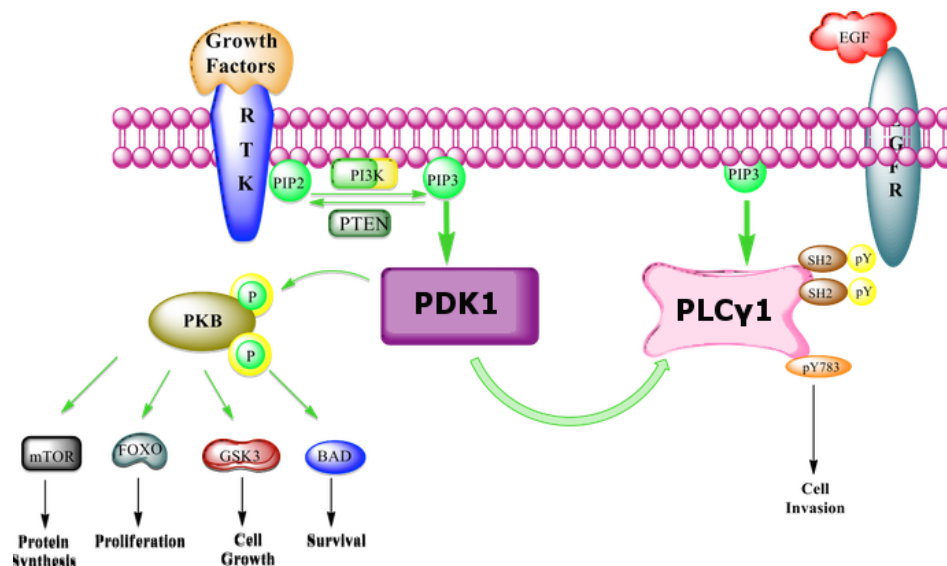


Figura 20. Rappresentazione schematica dei pathways Akt-dipendente e Akt-indipendente

Il meccanismo Akt-dipendente è caratterizzato dal coinvolgimento della serina-treonina chinasi Akt nella regolazione di effettori quali mTOR, Ras e GSK, che rivestono un ruolo chiave nella crescita, sopravvivenza e proliferazione cellulare. È stato recentemente dimostrato che questo stesso pathway è coinvolto anche nell'insorgenza della resistenza alle chemioterapie.

Il meccanismo Akt-indipendente prevede invece il coinvolgimento di PLCγ1, una fosfolipasi C specifica coinvolta nella regolazione di numerose funzioni cellulari tra cui il rimodellamento dell'actina nel citoscheletro e la migrazione

cellulare, rivestendo così un ruolo chiave nella metastatizzazione del tumore e nell'angiogenesi [6].

Entrambi i meccanismi, Akt-dipendente e Akt-indipendente, sono regolati dalla medesima proteina, PDK1, la chinasi 1 3-fosfoinositide dipendente, indicata anche come “*master kinase*”.

Questa tesi di laurea si è focalizzata sulla progettazione e sintesi di nuovi inibitori di PDK1 e/o di Akt, che caratterizzano il pathway PI3K/PDK1/Akt.

Nel laboratorio dove è stata svolta questa tesi di laurea, erano già stati sintetizzati diversi composti a struttura 2-oxo-indolica, variamente funzionalizzati in posizione 3 e 5 (Fig. 21).

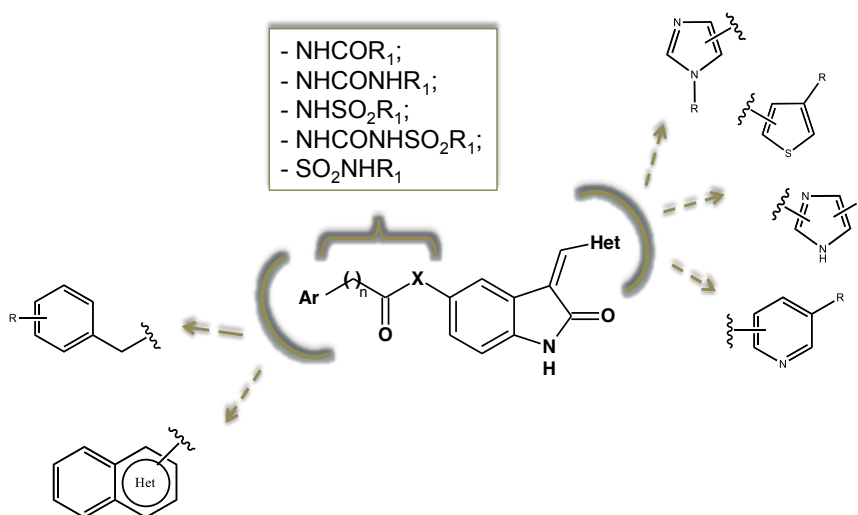


Figura 21. Struttura generale dei composti 2-oxo-indolici

Tali composti sono stati testati su linee cellulari A549 (Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cell Line), allo scopo di valutarne l'attività citotossica e l'indice apoptotico.

Tra i composti saggiati G24 e G31 (Fig. 22) hanno mostrato un indice apoptotico intorno al 20% e un IC_{50} di 0.66 e 2.75 μM rispettivamente. Tale attività citotossica, paragonata al farmaco di riferimento sunitinib ($IC_{50} = 6.61 \mu M$), è risultata essere 10 volte più potente per G24 e 2.5 volte maggiore per G31.

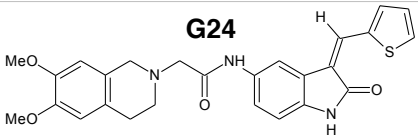
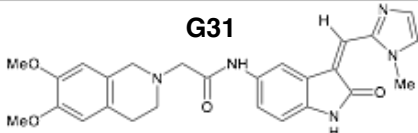
	IC ₅₀ (μM)	Apoptotic Index
G24 	0.66	24%
G31 	2.75	17%

Figura 22. IC₅₀ e indice apoptotico dei composti testati sulla linea cellulare A549

Con lo scopo di esplorare più approfonditamente il meccanismo di azione di tali derivati su alcuni bersagli molecolari coinvolti nel pathway PDK1/Akt, è stata effettuata un'analisi di Western Blot per valutare la fosforilazione di proteine cruciali nella cascata quali EGFR, Her2, Akt e FoxO (Fig. 23).

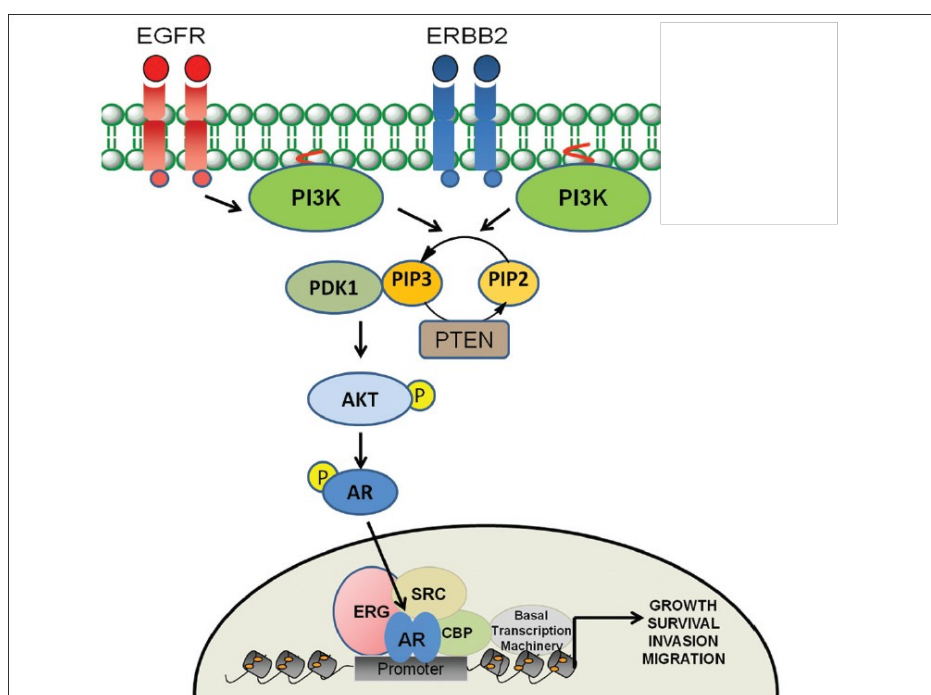


Figura 23. Il pathway PI3K/PDK1/Akt

I risultati hanno mostrato che G24 e G31 non modificano la fosforilazione di due proteine a monte che attivano il pathway, EGFR e Her2 (ERBB2); allo stesso tempo i composti testati inibiscono la fosforilazione di Akt sulla treonina 308 e di

FoxO, effettori a valle nel pathway. Ciò suggerisce che la cascata PI3K/PDK1/Akt rappresenta il target di tali composti per questa linea cellulare.

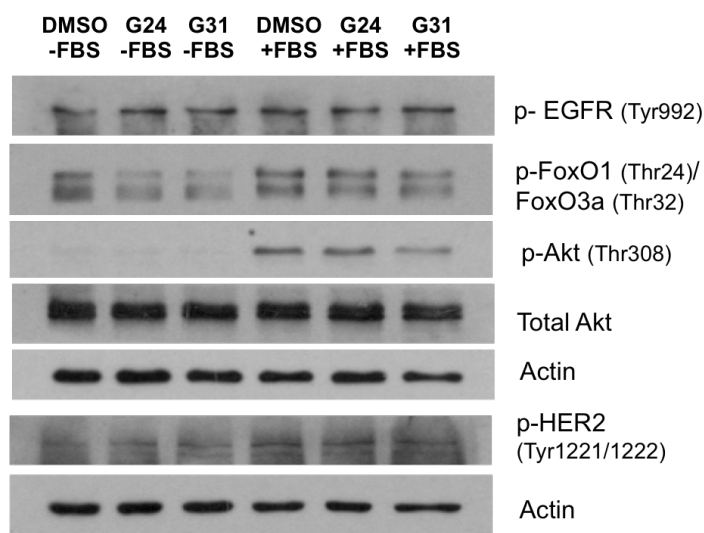


Figura 24. Western Blot delle proteine coinvolte nel pathway PDK1/Akt

Ulteriore conferma di tale affinità verso questa cascata è data dalla valutazione della citotossicità dei due composti sulla linea cellulare di adenocarcinoma mammario MDA-MB-231, in cui la crescita cellulare risulta essere indipendente dal pathway PDK1/Akt [5].

G24 e G31, testati alle concentrazioni di 1 e 10 μ M, non mostrano effetti significativi sulla proliferazione delle cellule MDA-MB-231, confermando così che l'attività citotossica è attribuibile a tale inibizione (Fig. 25).

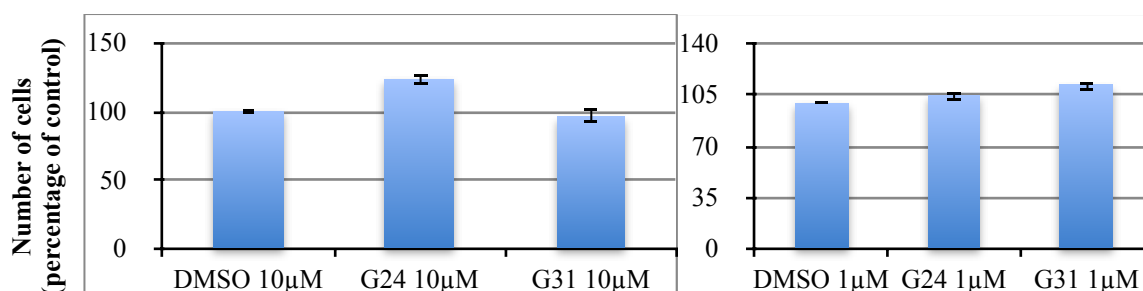


Figura 25. Effetti dei composti G24 e G31 sulla proliferazione cellulare di MDA-MB-231.

I risultati sono stati espressi come valori medi \pm SEM (n = 3)

Tenendo presente i risultati ottenuti con i composti ossindolici, in questa tesi di laurea sono stati sintetizzati nuovi composti con lo scopo di migliorare le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche. In particolare, le nuove molecole (**1 a-d**) sono state ottenute tramite la condensazione del nucleo 2-ossindolico con la porzione farmacoforica di MP7, un potente inibitore allosterico di PDK1.

Inoltre è stata affrontata la sintesi del derivato (**2**) in cui il farmaco di MP7 è stato condensato con il nucleo 6,7-dimetossitetraidroisochinolinico di G24 e G31 (Fig. 26).

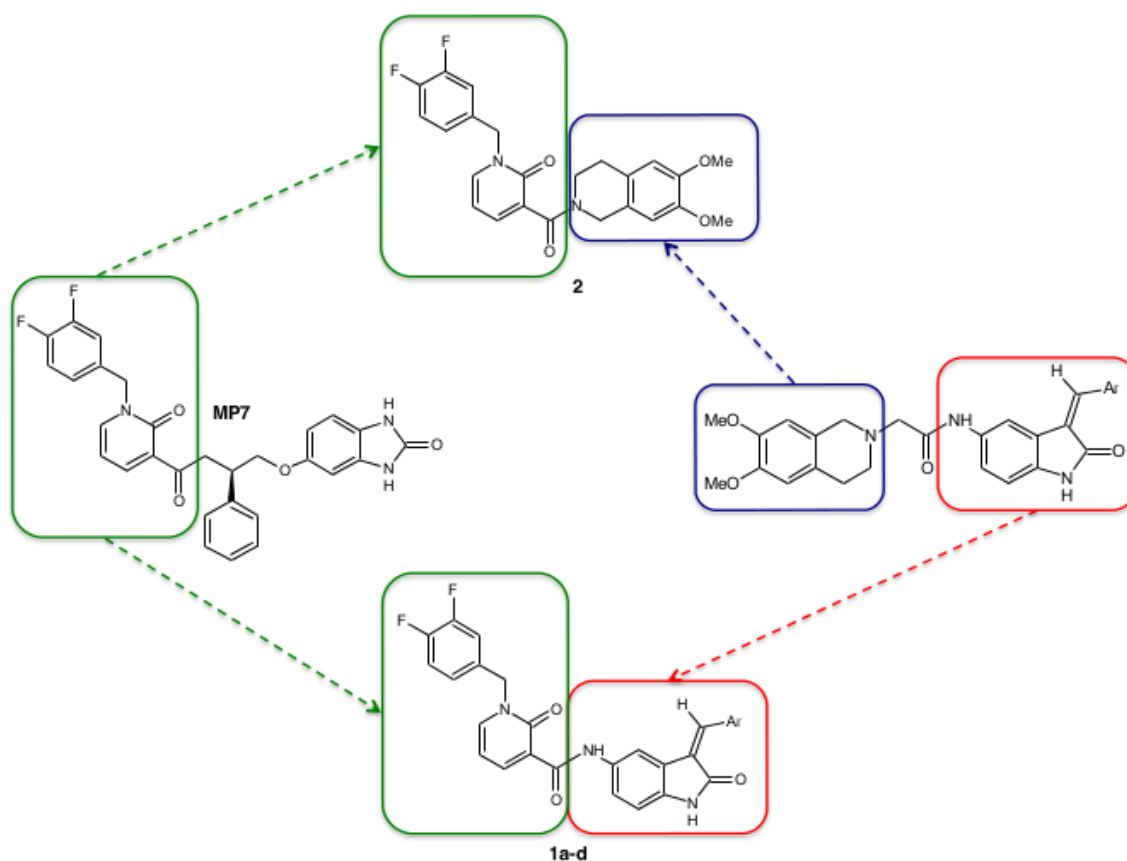
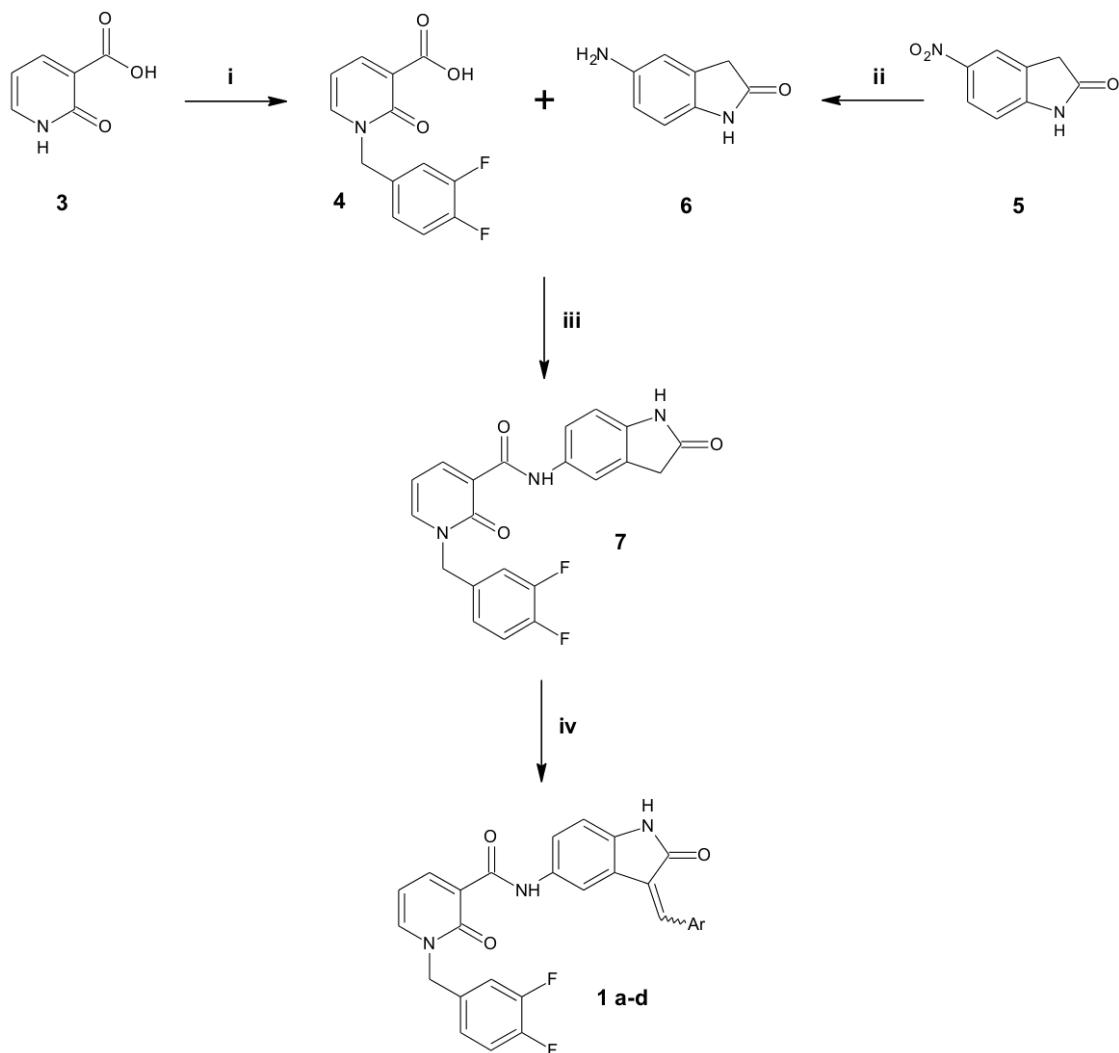


Figura 26. Rappresentazione schematica della struttura dei nuovi composti sintetizzati

SCHEMA 1



	a	b	c	d
Ar				

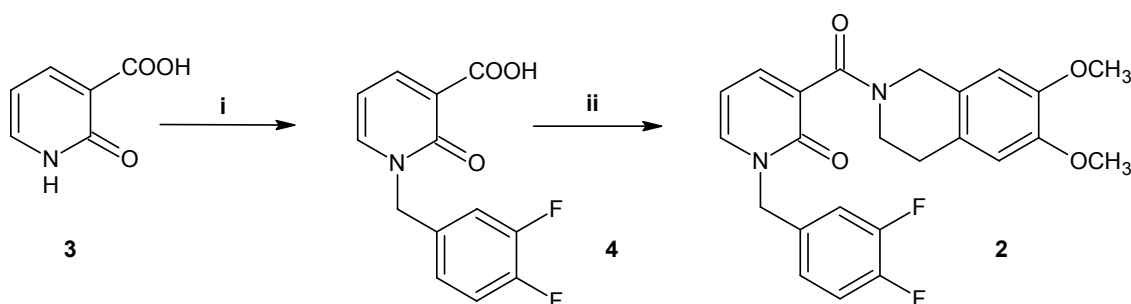
Reagenti e condizioni:

- i) 3,4-difluoro-benzilbromuro, NaH 60%, DMF anidra, 50 °C, 16 h;
- ii) H_2 , Pd/C 10%, EtOH assoluto, 16 h;
- iii) TBTU, DIPEA, DMF anidra, 16 h;
- iv) Carbossaldeide appropriata, EtOH assoluto, piperidina, 110 °C, 4 h.

Le ammidi **1 a-d** sono state sintetizzate seguendo la procedura descritta nello **schema 1**.

Il 5-nitro-oxindolo commerciale **5** è stato sottoposto ad una reazione di idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C in EtOH. Tale reazione ha portato alla formazione dell'ammina **6** che è stata fatta reagire con il composto **4** in presenza di TBTU e DIPEA per 16 ore, fornendo il derivato amidico **7**. Il derivato **4** era stato precedentemente sintetizzato tramite reazione di alchilazione con il 3,4-difluoro-benzilbromuro in presenza di NaH 60%. La successiva reazione di condensazione dell'intermedio **7** con l'appropriata carbossialdeide (2-tiofencarbossialdeide, 1-metil-2-imidazolo-carbossialdeide, imidazolo-5-carbossialdeide, 4-fluoro-benzaldeide) in EtOH assoluto e in presenza di una quantità catalitica di piperidina, ha condotto ai prodotti finali corrispondenti **1 a-d**.

SCHEMA 2



Reagenti e condizioni:

- i) 3,4-difluoro-benzilbromuro, NaH 60%, DMF anidra, 50 °C, 16 h;
- ii) 6,7-dimetossi-1,2,3,4-tetraidroisochinolina cloridrato, TBTU, DIPEA, DMF anidra, 16 h.

L'ammide **2** è stata sintetizzata seguendo la procedura descritta nello **schema 2**.

L'acido 2 oxo-nicotinico **3** è stato sottoposto a una reazione di alchilazione con il 3,4-difluoro-benzilbromuro in presenza di NaH 60%. Il derivato carbossilico ottenuto **4** è stato fatto reagire con la 6,7-dimetossi-1,2,3,4-tetraidroisochinolina cloridrato in presenza di TBTU e DIPEA per 16 ore, fornendo il prodotto finale **2**.

I composti della serie **1** sono stati ottenuti come isomero E (**1b** e **1d**) o come miscela E/Z (**1c**), ad eccezione del derivato **1a**. Tale risultato è evidenziato dai valori di chemical shift dei segnali del protone in posizione 4 dell'indolone. L'isomero Z presenta valori di chemical shift compresi nell'intervallo 7.70-8.40 ppm, mentre il protone dell'isomero E in C4 risuona a valori di 1 ppm più bassi. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura per le strutture analoghe [19].

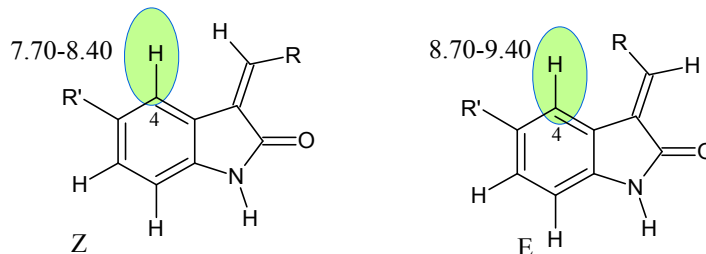


Figura 27. Valori di chemical shift dei protoni diagnostici negli isomeri Z ed E

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

La struttura di tutti i composti è stata controllata per mezzo della spettrometria ^1H -NMR. Degli spettri ^1H -NMR sono stati riportati i particolari più significativi.

Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Bruker operante a 400 MHz in DMSO-d_6 . I chemical shift δ sono espressi in ppm.

Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di Chimica Analitica; la differenza tra i valori teorici e quelli calcolati risulta essere compresa in un intervallo di $\pm 0.4\%$.

Le evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando Na_2SO_4 .

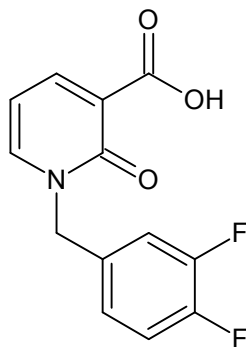
Le TLC analitiche sono state effettuate usando lastre MERK di gel di silice (G60) contenenti un indicatore di fluorescenza 20 x 20.2 mm. Le varie macchie sono state evidenziate per mezzo di lampada UV (256 nm).

Per la filtrazione su celite è stata usata celite® 521.

Per le idrogenazioni è stato usato il generatore d'idrogeno HG 2000 CLAIND®.

Per le cromatografie su colonna è stato usato gel di silice MERK 70-230 Mes.

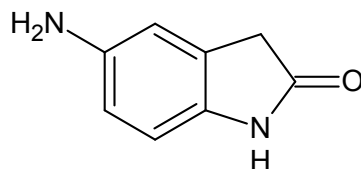
SCHEMA 1

Sintesi del derivato 1-(3,4-difluorobenzil)-2-oxo-1,2-diidropiridin-3-acido carbossilico (4)

Una sospensione di acido 2-idrossi-nicotinico (400 mg, 2.87 mmoli) e NaH 60% in DMF anidra (5 ml) è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Trascorso tale periodo, è stato aggiunto il 3,4-difluoro-benzilbromuro (0.44 ml, 3.43 mmoli) e la miscela scaldata a 50 °C per 16 h. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo triturato in H₂O e filtrato su setto. Tale solido è stato posto a reflusso per 4 h in NaOH al 10%. La soluzione raffreddata è stata portata a pH acido in ghiaccio; il nuovo precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione ed infine triturato con esano per dare il derivato 4.

Resa: 78%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 5.29 (s, 2H, CH₂); 6.76 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, Ar); 7.23-7.25 (m, 1H, Ar); 7.40-7.52 (m, 2H, Ar); 8.40 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Ar) ppm.

SCHEMA 1**Sintesi del derivato 5-amino-2-ossindolo (6)**

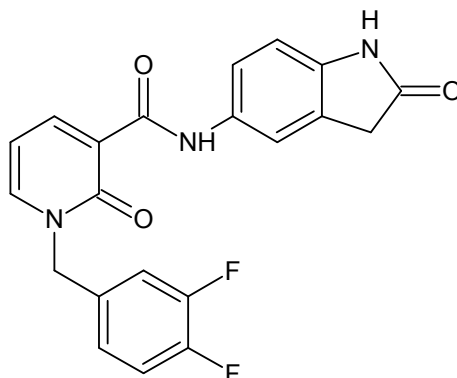
Il 5-nitro-2-ossindolo commerciale (500 mg, 2.81 mmoli) in EtOH assoluto è stato sottoposto a reazione di idrogenazione, in presenza di Pd/C al 10% (156 mg, 1.47 mmoli) per 16 h a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo, il catalizzatore è stato rimosso tramite filtrazione su celite ed il solvente è stato evaporato per ottenere il derivato **6**.

Resa: 87%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3.29 (s, 2H, CH₂); 4.62 (s, 2H, NH₂); 6.37 (dd, 1H, J = 2.2, 8.2 Hz, Ar); 6.48-6.50 (m, 2H, Ar), 9.90 (s, 1H, NH) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi del derivato 1-(3,4-difluorobenzil)-2-oxo-N-(2-ossindol)-1,2-diidropiridin-3-carbossiammidico (7)



Ad una soluzione del composto 4 (300 mg, 1.13 mmoli) in DMF anidra (7 ml) raffreddata a 0 °C sono state aggiunte TBTU (363 mg, 1.13 mmoli) e DIPEA (6.85 ml, 39.55 mmoli). Dopo agitazione di 30' in ghiaccio è stato aggiunto il composto 6 (168 mg, 1.13 mmoli) e la temperatura mantenuta a 0 °C per altri 30'. La miscela di reazione è stata quindi portata a t. a. e lasciata in agitazione per 16 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di CHCl₃/CH₃OH (10:0 a 9.6:0.4) per dare il derivato 7.

Resa: 47%

P. f.: 285-288 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3.48 (s, 2H, CH₂); 5.28 (s, 2H, CH₂); 6.68 (dd, 1H, *J* = 6.6, 7.2 Hz, Ar); 6.77 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.20-7.23 (m, 1H, Ar); 7.40-7.52 (m, 3H, Ar); 7.66 (s, 1H, Ar); 8.29 (dd, 1H, *J* = 2.2, 6.6 Hz, Ar); 8.46 (dd, 1H, *J* = 2.2, 7.2 Hz, Ar); 10.33 (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, NH) ppm.

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 176.23, 161.54, 160.73, 150.35, 147.90, 143.78, 143.42, 139.86, 134.02, 132.32, 126.40, 124.90, 120.35, 119.02, 117.74, 117.25, 116.90, 109.10, 107.22, 51.45, 36.02 ppm.

ANALISI ELEMENTARE

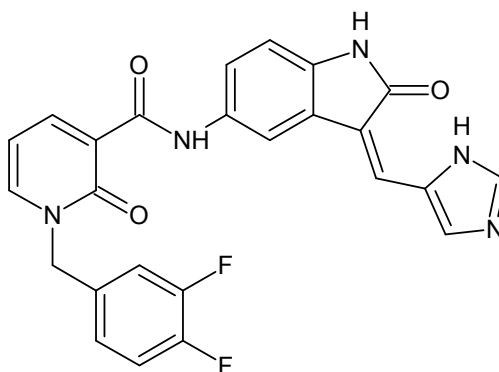
$\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$	C%	H%	N%
Calc.%	63.80%	3.82%	10.63%
Trov. %	63.72%	3.55%	10.50%

SCHEMA 1

Procedura generale per la sintesi dei derivati 1 a-d

Ad una soluzione del composto 7 (50 mg, 0.13 mmoli) in EtOH assoluto sono stati aggiunti l'opportuna carbossiadeide commerciale (0.13 mmoli) ed una quantità catalitica di piperidina. La reazione è stata scaldata a 110 °C per 4 h, quindi il solvente è stato evaporato ottenendo un grezzo che è stato purificato mediante cristallizzazione da EtOH per fornire i derivati **1a-d**.

- **1a: (Z)-N-(3-[5-(1H-imidazol)metilen]-2-ossindol)-1-(3,4-difluorobenzil)-2-oxo-1,2-diidropiridin-3-carbossiammide**



Resa: 34%

P. f.: 285-288 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.31 (s, 2H, CH₂); 6.70 (dd, 1H, *J* = 6.8, 7.2 Hz, Ar); 6.87 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.22-7.25 (m, 1H, Ar); 7.42-7.62 (m, 3H, Ar); 7.68 (s, 1H, Ar); 7.94 (s, 1H, CH=); 8.01 (s, 1H, Ar); 8.03 (s, 1H, Ar); 8.32 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar); 8.50 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, Ar); 11.00 (s, 1H, NH); 11.99 (s, 1H, NH) ppm.

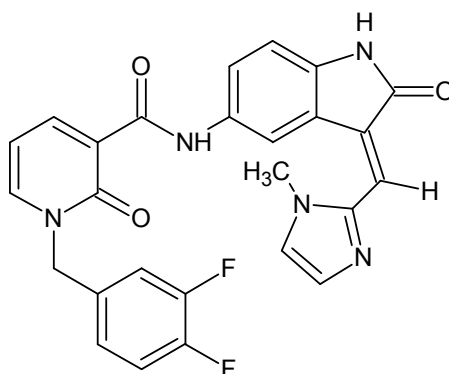
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 169.05, 161.58, 160.85, 150.36, 147.91, 143.85, 143.55, 139.67, 138.75, 136.10, 134.09, 132.79, 128.13, 124.85, 123.45, 120.29, 119.87, 117.86, 117.69, 117.25, 117.08, 111.39, 109.94, 107.28, 51.53 ppm.

^{19}F -NMR (DMSO- d_6): -138.13 (d, 1F, $J = 24$ Hz, Ar); -139.76 (d, 1F, $J = 24$ Hz, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE

$\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$	C%	H%	N%
Calc. %	63.15%	4.03%	14.73%
Trov. %	63.34%	4.17%	14.89%

- 1b: (E)-1-(3,4-difluorobenzil)-N-(3-[(1-metil-imidazol)metilen]-2-ossindol)-2-oxo-1,2-diidropiridin-3-carbossiamide**



Resa: 32%

P. f.: 284-287 °C

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 3.89 (s, 3H, CH_3); 5.29 (s, 2H, CH_2); 6.66 (dd, 1H, $J = 6.8, 7.2$ Hz, Ar); 6.82 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar); 7.24-7.26 (m, 1H, Ar); 7.32 (s, 1H, Ar); 7.37 (s, 1H, Ar); 7.40-7.47 (m, 1H, Ar) 7.50-7.54 (m, 1H, Ar); 7.53 (s, 1H, $\text{CH}=\text{H}$); 7.82 (dd, 1H, $J = 2.1, 8.2$ Hz, Ar); 8.28 (dd, 1H, $J = 2.0, 6.4$ Hz, Ar); 8.46 (dd, 1H, $J = 2.0, 7.2$ Hz, Ar); 9.38 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, C4 Ar); 10.54 (s, 1H, NH); 11.85 (s, 1H, NH) ppm.

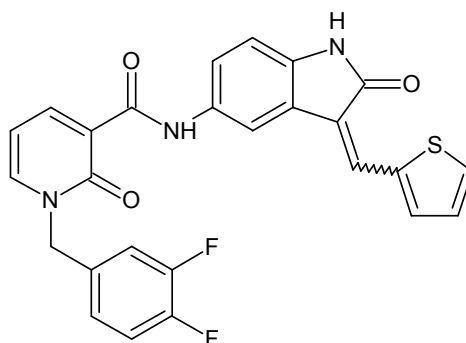
^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 169.93, 162.09, 161.34, 150.86, 148.42, 144.30, 143.87, 142.97, 139.68, 134.53, 132.49, 130.85, 125.95, 125.57, 122.96,

122.52, 120.90, 120.59, 118.72, 118.32, 118.11, 117.88, 109.63, 107.68, 52.01, 33.78 ppm.

ANALISI ELEMENTARE

$C_{26}H_{19}F_2NO_3$	C%	H%	N%
Calc. %	64.06%	3.93%	14.37%
Trov. %	64.31%	4.02%	14.59%

- 1c: (*E/Z*)-1-(3,4-difluorobenzil)-N-(3-((2-tiofene)metilen)-2-ossindol)-2-oxo-1,2-diidropiridin-3-carbossiammide (mix 1:1)



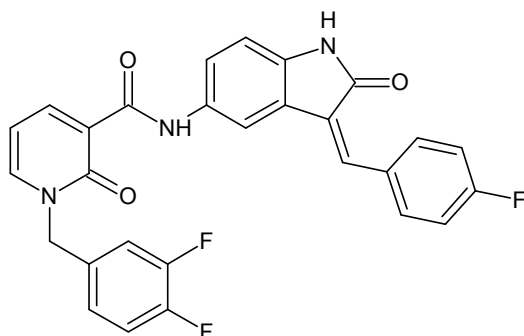
Resa: 30%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 5.30 (s, 2H, CH_2); 6.70 (m, 1H, Ar); 6.82-6.89 (m, 2H, indolo E+Z); 8.31 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar); 8.94 (s, 1H, C4 Ar, isomero E); 10.61 (s, 1H, NH); 11.96 (s, 1H, NH) ppm.

ANALISI ELEMENTARE

$C_{26}H_{17}F_2NO_3S$	C%	H%	N%	S%
Calc. %	63.80%	3.50%	8.58%	6.55%
Trov. %	64.12%	3.75%	8.82%	6.80%

- **1d: (E)-1-(3,4-difluorobenzil)-N-(3-(4-fluorobenzilidene)-2-ossindol)-2-oxo-1,2-diidropiridin-3-carbossiamide**



Resa: 40%

P. f.: 224-230 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 5.27 (s, 2H, CH₂); 6.66 (dd, 1H, *J* = 6.8, 7.2 Hz, Ar); 6.86 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.20-7.24 (m, 1H, Ar); 7.34-7.37 (m, 2H, Ar); 7.43-7.52 (m, 3H, Ar); 7.64 (s, 1H, CH=); 7.82 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, Ar); 7.84 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, Ar); 8.21 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, C4 Ar); 8.29 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz, Ar); 8.44 (dd, 1H, *J* = 2.0, 7.2 Hz, Ar); 10.61 (s, 1H, NH); 11.83 (s, 1H, NH) ppm.

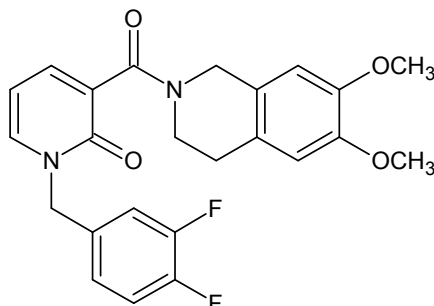
¹⁹F-NMR (DMSO-d₆): δ -110.24 (s, 1F, Ar); -138.18 (d, 1F, *J* = 24 Hz, Ar); -139.71 (d, 1F, *J* = 24 Hz, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE

$C_{28}H_{18}F_3N_3O_3$	C%	H%	N%
Calc.%	67.06%	3.62%	8.38%
Trov. %	66.87%	3.52%	8.25%

SCHEMA 2

Sintesi del derivato 1-(3,4-difluorobenzil)-3-(6,7-dimetossi-1,2,3,4-tetraidroisochinolina-2-carbonil)piridin-2-one (2)



Ad una soluzione del composto 4 (125 mg, 0.47 mmoli) in DMF anidra (3 ml) raffreddata a 0 °C sono state aggiunte TBTU (152 mg, 0.47 mmoli) e DIPEA (2.85 ml, 16.49 mmoli). Dopo agitazione di 30' in ghiaccio è stata aggiunta la 6,7-dimetossi-1,2,3,4-tetraidroisochinolina cloridrato commerciale (109 mg, 0.47 mmoli) e la temperatura mantenuta a 0 °C per altri 30'. La miscela di reazione è stata quindi portata a t. a. e lasciata in agitazione per 16 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di CHCl₃/CH₃OH (10:0 a 9.9:0.1) per dare il derivato **2**.

Resa: 48%

P. f.: 75-80 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 2.73 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz, CH₂); 3.40 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz, CH₂); 3.71 (s, 3H, OCH₃); 3.73 (s, 3H, OCH₃); 4.63 (s, 2H, CH₂); 5.14 (s, 2H, CH₂); 6.38 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, Ar); 6.71 (s, 1H, Ar); 6.84 (s, 1H, Ar); 7.19-7.22 (m, 1H, Ar); 7.41-7.48 (m, 2H, Ar); 7.54 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.8 Hz, Ar); 7.99 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.8 Hz, Ar) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ 166.04, 158.95, 151.54, 149.11, 147.76, 140.42, 139.44, 138.66, 132.97, 129.22, 126.66, 125.84, 124.51, 117.52, 111.46,

109.00, 106.20, 55.92, 51.97, 48.04, 44.40, 28.56 ppm.

^{19}F -NMR (DMSO- d_6): δ -136.42 (d, 1F, $J = 24$ Hz, Ar); -137.97 (d, 1F, $J = 24$ Hz, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE

$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$	C%	H%	N%
Calc. %	65.45%	5.03%	6.36%
Trov. %	65.23%	4.95%	6.12%

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] Lindsley C.W., Barnett S.F., Layton M.E., Bilodeau M.T.; *The PI3K/Akt pathway: Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors*; Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1): 7-18.
- [2] Harris T.K.; *PDK1 and PKB/Akt: Ideal Targets for Development of New Strategies to Structure-Based Drug Design*. Life, 2003, 55(3): 117-26.
- [3] Carracedo A., Pandolfi P.P.; *The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks*; Oncogene, 2008, 27: 5527-41.
- [4] Cantley L.C., Neel B.G.; *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*; Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(8): 4240-5.
- [5] Raimondi C., Chick A., Maffucci T., Falasca M.; *A novel regulatory mechanism links PLC γ 1 to PDK1*; Journal of Cell Science, 2012.
- [6] Sala et al.; *Phospholipase C γ 1 Is Required for Metastasis Development in cancer*; Cancer Research, 2008, 68(24): 10187-96.
- [7] Wick M.J., Ramos F.J., Chen H., Quon M.J., Dong L.Q., Liu F.; *Mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 undergoes dimerization and trans-phosphorylation in the activation loop*; J. Biol. Chem., 2003, 278: 42913-19.
- [8] Alessi D.R. et al.; *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α* ; Curr. Biol., 1997, 7(4): 261-9.

-
- [9] Kumar C.C., Madison V.; *Akt crystal structure and Akt-specific inhibitors*; Oncogene, 2005, 24(50): 7493-501.
- [10] Coffey P.J., Woodgett J.R.; *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*; Eur J Biochem, 1991, 201(2): 475-81.
- [11] Nakatani K., Thompson D.A., Barthel A., Sakae H., Liu W., Weigel R.J. *et al.*; *Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines*; J Biol Chem, 1999, 274(31): 21528-32.
- [12] Toker A., Newton A.C.; *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*; J Biol Chem, 2000, 275: 8271-74.
- [13] Pei H., Li L., Fridley B.L., Jenkins G.D., Kalari K.R., Lingle W. *et al.*; *FKBP51 affects cancer cells response to chemotherapy by negatively regulating Akt*; Cancer Cell, 2009, 16: 259-66.
- [14] Hay N., Sonenberg N.; *Upstream and downstream of mTOR*; Genes Dev, 2004, 18(16): 1926-45.
- [15] Cheng J.Q., Lindsley C.W., Cheng G.Z., Yang H., Nicosia S.V.; *The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery*; Oncogene, 2005, 24(50): 7482-92.
- [16] Eccles S.A.; *Targeting key steps in metastatic tumour progression*; Current Opinion in Genetics & Development, 2005, 15(1): 77-86.
- [17] Medina J.R., Becker C.J., Blackledge C.W., Duquenne C., Feng Y., Grant S.W., Heerding D., Li W.H., Miller W.H., Romeril S.P., Scherzer D., Shu

- A., Bobko M.A., Chadderton A.R., Dumble M., Gardiner C.M., Gilbert S., Liu Q., Rabindran S.K., Sudakin V., Xiang H., Brady P.G., Campobasso N., Ward P., Axten J.M.; *Structure-based design of potent and selective 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors*; J. Med. Chem., 2011, 54: 1871-95.
- [18] Li Q.; *Recent progress in the discovery of Akt inhibitors as anticancer agents*; Expert Opin. Ther. Patents, 2007; 17(9): 1077-1130.
- [19] Sun L.; *Synthesis and Biological Evaluations of 3-Substituted Indolin-2-ones: A Novel Class of Tyrosine Kinase Inhibitors That Exhibit toward Particular Receptor Tyrosine Kinases*; J. Med. Chem.; 41(14): 2588-2603.